

Hovedfagsoppgave i farmakologi for graden Candidata pharmaciae

***In vitro* undersøkelse av statinindusert
muskeltoksisitet**

Kjersti Hoel



Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Høsten 2007

Hovedfagsoppgave i farmakologi for graden Candidata pharmaciae

***In vitro* undersøkelse av statinindusert
muskeltoksisitet**

Kjersti Hoel



Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Høsten 2007

Veiledere:

Professor Anders Åsberg, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt

Stipendiat Ine B. Skottheim, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt

Førsteamanuensis Ane Gedde-Dahl, Avdeling for helsefag, Høyskolen i Oslo

1 FORORD

Denne hovedfagsoppgaven er utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap under veiledning av professor Anders Åsberg, stipendiat Ine Blankenberg Skottheim og førsteamanuensis Ane Gedde-Dahl. Arbeidet ble påbegynt november 2006 og avsluttet oktober 2007.

Jeg vil gjerne få takke professor Anders Åsberg. Han har gitt meg svært god veiledning og vist stor entusiasme for mine resultater og prosjektet for øvrig. Jeg vil også takke stipendiat Ine Blankenberg Skottheim som har veiledet meg både med det praktiske og det teoretiske arbeidet. Hun har utvist stor tålmodighet og faglig dyktighet, og bidratt med mange gode råd. Ane Gedde-Dahl har vært min eksterne veileder. En stor takk til henne for mange verdifulle innspill og spørsmål vedrørende mine resultater.

Mari-Ann Baltzersen har vært ansvarlig for opplæring og arbeid på celledlaboratoriet. Hennes faglig dyktige veiledning og hyggelig samarbeid har fått meg til å trives veldig godt på celledlaboratoriet. Arbeid med celler har utgjort en stor del av det praktiske arbeidet ved denne hovedfagsoppgaven.

Mange takk til alle ansatte og hovedfagsstudenter ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap. Jeg har trivdes svært godt i deres selskap.

Det praktiske arbeidet har ført til at jeg har tilbrakt en del tid på ZEB. Tusen takk for lån av fluorescensmikroskop og velvillighet og hjelp ved spørsmål rundt bruken av det.

Blindern, oktober 2007

Kjersti Hoel

2 INNHOLDSFORTEGNELSE

1	FORORD.....	3
2	INNHOLDSFORTEGNELSE.....	4
3	FORKORTELSER.....	6
4	SAMMENDRAG	8
5	INNLEDNING	10
5.1	Hyperlipidemi.....	10
5.1.1	Definisjon	10
5.1.2	Årsaker	10
5.1.3	Terapianbefaling.....	10
5.2	Generelt om HMG-CoA reduktase hemmere (statiner)	11
5.2.1	Klassifisering og strukturformler	11
5.2.2	Virkningsmekanisme.....	13
5.2.3	Syre-lakton likevekt	14
5.2.4	Metabolisme	15
5.2.5	Lipofilisitet	15
5.2.6	Interaksjoner.....	16
5.2.7	Bivirkninger	17
5.3	Muskelbivirkninger av HMG-CoA reduktase hemmere (statiner)	18
5.3.1	Skjelettmuskulatur.....	18
5.3.2	Klassifisering av statininduserte muskelbivirkninger	18
5.3.3	Mulige mekanismer bak statinindusert muskeltoksisitet	20
5.3.4	Hemming av statinindusert muskeltoksisitet med mevalonat	24
5.3.5	Genetiske risikofaktorer assosiert med statinindusert myopati.....	25
5.3.6	Risikofaktorer for utvikling av rabdomyolyse ved bruk av statin.....	29
6	PROBLEMSTILLING	30
7	MATERIALE OG METODER	31
7.1	Materiale.....	31
7.1.1	Cellemateriale.....	31
7.2	Metoder	32
7.2.1	Satellittcelle isolering.....	32
7.2.2	Coating av 12 brønners plater	32
7.2.3	Utsåing av satellittceller	32
7.2.4	Proliferasjon av satellittceller og differensiering til muskelfibre.....	33

7.2.5	Inkubering med statin og eventuelt mevalonat	35
7.2.6	Måling av statinindusert celledød	35
7.2.7	Statistisk analyse	37
8	RESULTATER.....	38
8.1	Hemming av statinindusert muskeltoksisitet ved tilsetning av mevalonat	38
8.1.1	Mevalonat løst i vann eller buffer	38
8.1.2	Pre- og/eller koinkubasjon med mevalonat.....	39
8.1.3	Mevalonat tilsatt muskelfibre ved økende inkubasjonstid med statin.....	40
8.1.4	Mevalonat tilsatt muskelfibre i økende konsentrasjon.....	41
8.1.5	Effekter av mevalonat ved ulike nivåer av statinindusert myotoksisitet.....	42
8.1.6	Mevalonat tilsatt muskelfibre inkubert med statin på syre- eller laktonform	43
8.2	Muskelceller fra pasienter med statininduserte muskelbivirkninger.....	44
8.3	Endring i morfologi etter statininkubasjon.....	45
9	DISKUSJON	47
9.1	Hemming av statinindusert muskeltoksisitet ved tilsetning av mevalonat.	47
9.2	Muskelceller fra pasienter med statininduserte muskelbivirkninger.....	51
10	KONKLUSJON	52
10.1	Hemming av statinindusert muskeltoksisitet ved tilsetning av mevalonat	52
10.2	Muskelceller fra pasienter med statininduserte muskelbivirkninger.....	52
10.3	Hva kan gjøres videre?	53
11	REFERANSELISTE.....	54
12	APPENDIKS.....	57
12.1	Kjemikalieliste	57
12.2	Utstyrsliste.....	58
12.3	Løsninger.....	58
12.4	Behandling av rådata.....	60
12.5	Hemming av statinindusert muskeltoksisitet ved tilsetning av mevalonat (rådata)	64
12.6	Muskelceller fra pasienter med statininduserte muskelbivirkninger (rådata)	71
12.7	Normalfordeling av rådata fra friske frivillige.....	75
12.8	Normalfordeling av rådata fra pasienter.....	77

3 FORKORTELSER

ABC	Adenosintrifosfat bindende kassett
ADP	Adenosindifosfat
AL	Atorvastatin lakton
AMD	Atorvastatin muskeldonor
AMP	Adenosinmonofosfat
ANOVA	Analysis of variance
AS	Atorvastatin syre
ATP	Adenosintrifosfat
AUC	Areal under plasmakonsentrasjonstidskurven
BMI	Body mass index
CACNA1S	Calcium channel alpha-subunit
CK	Kreatin kinase
CO ₂	Karbondioksid
CPT	Carnitine palmitoyltransferase
CYP 450	Cytokrom P450
DDD	Definerte døgndoser
DMEM	Dulbecco's modified Eagles's medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ECM	Ekstracellulært matriks
ER	Endoplasmatisk retikulum
FCS	Føtalt kalveserum
FdA	Fluorescein diacetat
FPP	Farnesylpyrofosfat
GGPP	Geranylgeranylpyrofosfat
GI	Gastrointestinal
HDL	High density lipoprotein
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IPP	Isopentenyl pyrofosfat
KCl	Kaliumklorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenfosfat

LD	Levende donor
LDL	Low density lipoprotein
MEF	Myocyte enhancer factor
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenfosfat
NaCl	Natriumklorid
PBS	Fosfatbuffret saltvann
Pgp	P-glykoprotein
PI	Propidiumiodid
PRIMO	Prediction of Muscular Risk in Observational conditions
RPM	Runder per minutt
RYR	Ryanodin reseptor
SD	Standard deviation (standardavvik)
Sec-tRNA	Selenocystein-transport ribonukleinsyre
SEM	Standard error of the mean ($SEM = SD/\sqrt{n}$)
SL	Simvastatin lakton
SR	Sarkoplasmatisk retikulum
SS	Simvastatin syre
UGT	UDP-glucuronosyl-transferase
VLDL	Very low density lipoprotein
ZEB	Zoofysiologi, ernæringsforskning og biokjemi

4 SAMMENDRAG

Bakgrunn: Legemiddelgruppen statiner er førstehåndspreparater ved behandling av hyperlipidemi i Norge. Erfaringer fra klinisk bruk viser at statiner vanligvis tolereres godt, men insidensen av muskelbivirkninger er rapportert til 1-7 % og ser ut til å være doseavhengig. En nyere studie, PRIMO-studien, viste imidlertid at 10,5 % av pasienter på høydose statin opplevde muskelsmerter. For simvastatin var insidensen hele 18,2 % ved bruk av doser på 40-80 mg. Nyere data foreslår bruk av høyere statindoser for å redusere blodlipidene kraftigere. Statininduserte muskelbivirkninger kan derfor bli et økende problem i fremtiden. Muskeltoksisiteten varierer i alvorlighetsgrad, og den molekylære mekanismen bak er foreløpig ikke kjent. Laktonformen er vist å være mer myotoksisk enn syreformen *in vitro*, og det er en forskjell i myotoksisitet mellom de ulike statinene.

Mål: I denne hovedfagsoppgaven, som består av to deler, skal statininduserte muskelbivirkninger studeres nærmere. Det skal undersøkes om det er mulig å hemme statinindusert muskeltoksisitet ved å tilsette mevalonat til statininkuberte muskelceller *in vitro*. Videre skal det undersøkes om muskelceller fra pasienter med påviste statininduserte muskelbivirkninger er mer mottakelige for statinindusert muskeltoksisitet *in vitro* enn muskelceller fra friske donorer.

Metode: Primære, humane skjelettmuskelceller differensieres og inkuberes deretter med økende konsentrasjon statin på syre- eller laktonform, og eventuelt mevalonat. Graden av celledød bestemmes ved kvantitativ måling etter farging med et fluorescerende stoff.

Resultater: Det er i denne *in vitro* modellen ikke funnet at mevalonat hemmer statinindusert muskeltoksisitet verken for syre- eller laktonform av simvastatin og atorvastatin.

Økende konsentrasjon av syre- eller laktonform av henholdsvis simvastatin og atorvastatin gir økende muskeltoksisitet på muskelceller isolert fra pasienter med påviste statininduserte muskelbivirkninger. Atorvastatin syre- og lakton samt simvastatin syre induserte en signifikant større grad av muskeltoksisitet på muskelceller fra pasienter sammenliknet med muskelceller fra friske frivillige. Det var ingen påvisbar forskjell i muskeltoksisk potensial av simvastatin lakton mellom gruppene.

Konklusjon: Mevalonat hemmet ikke muskeltoksisitet forårsaket av statin på syre- eller laktonform i denne *in vitro* modellen. Muskelceller fra pasienter med påviste statininduserte muskelbivirkninger viser en signifikant økt følsomhet for statiner sammenliknet med muskelceller fra friske frivillige.

5 INNLEDNING

5.1 Hyperlipidemi

5.1.1 Definisjon

Hyperlipidemi defineres som en tilstand med et unormalt høyt nivå av kolesterol, triglyserider og fosfolipider i blodet. Det kliniske utfallet vil være avhengig av hvilke faktorer og i hvilken grad disse er forhøyet. Flere studier har vist at økt nivå av LDL er en uavhengig og sikker risikofaktor for kardiovaskulær sykdom (1). Ved å senke kolesterolet kan man redusere risikoen for hjerte- og karsykdommer (1).

5.1.2 Årsaker

Hyperlipidemi kan være forårsaket av primære eller sekundære årsaker. Primær hyperlipidemi skyldes ofte en genetisk defekt i lipid-metabolismen, hvilket fører til redusert aktivitet av LDL-reseptorer og med påfølgende akkumulering av LDL i plasma (1). De vanligste årsakene til sekundær hyperlipidemi er, etter kosthold, hypotyreose, diabetes, Cushings syndrom, lever- og nyreskade samt alkoholisme (1).

5.1.3 Terapianbefaling

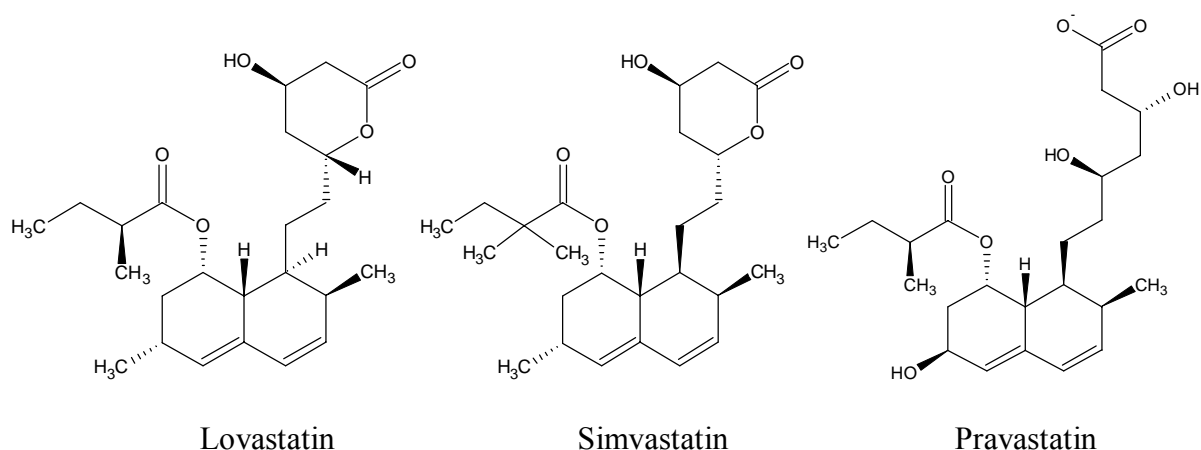
Behandling av hyperlipidemi bør starte med kostintervensjon for å redusere blodlipidene, øke den fibrinolytiske aktiviteten samt redusere en eventuell overvekt (2). Hvis dette ikke fører frem til ønskelig blodlipidnivå (kolesterol < 5,0 mmol/L og LDL < 3,0 mmol/L) må medikamentell behandling vurderes med tanke på den totale kardiovaskulære risiko. Aktuelle medikamenter er statiner, resiner, Omega-3-fettsyrer, kolesterolabsorpsjonshemmere, nikotinsyrepreparater og fibrater. De to sistnevnte medikamentgrupper er ikke registrerte legemidler i Norge. Legemiddelgruppen statiner er førstehåndspreparater ved behandling av hyperlipidemi i Norge (3). I 2005 ble det i Norge registrert om lag 330 000 brukere av statiner, 46 % kvinner og 54 % menn. Simvastatin var i 2006 det mest solgte (i millioner DDD) reseptpliktige legemidlet fra norske apotek (4). Store kliniske studier har vist at statiner

er effektive og trygge kolesterolsenkende medikamenter (5). Nyere data kan tyde på at enda høyere doser vil gi en ytterligere reduksjon i LDL nivået og dermed redusere risikoen for kardiovaskulær sykdom. Denne titreringen mot høyere doser vil føre til økt risiko for statininduserte muskelbivirkninger (5).

5.2 Generelt om HMG-CoA reduktase hemmere (statiner)

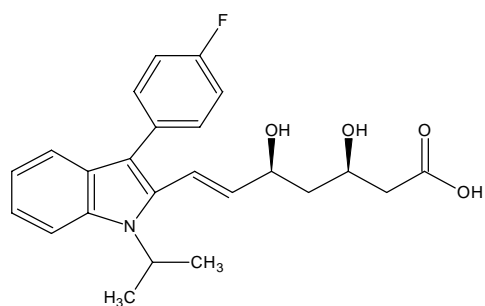
5.2.1 Klassifisering og strukturformler

1. generasjonsstatiner (lovastatin, simvastatin og pravastatin) er soppmetabolitter og har den samme naftalen ringstrukturen (Figur 1) (6). Pravastatin ble isolert fra soppen *Penicillium citrinum*, mens lovastatin noen år senere ble isolert fra soppene *Monascus ruber* og *Aspergillus terreus*. Simvastatin syntetiseres fra lovastatin ved metylering av sidekjeden (7).

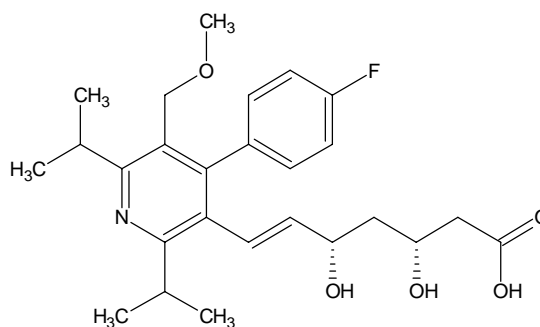


Figur 1. 1. generasjonsstatiner.

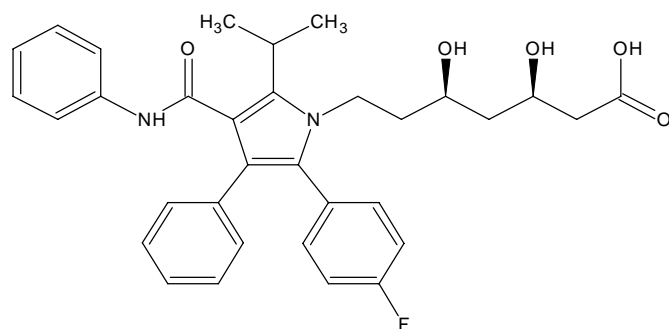
2. generasjonsstatiner (fluvastatin, cerivastatin og atorvastatin) er syntetisk fremstilt og er strukturelt forskjellige (Figur 2) (6).



Fluvastatin



Cerivastatin

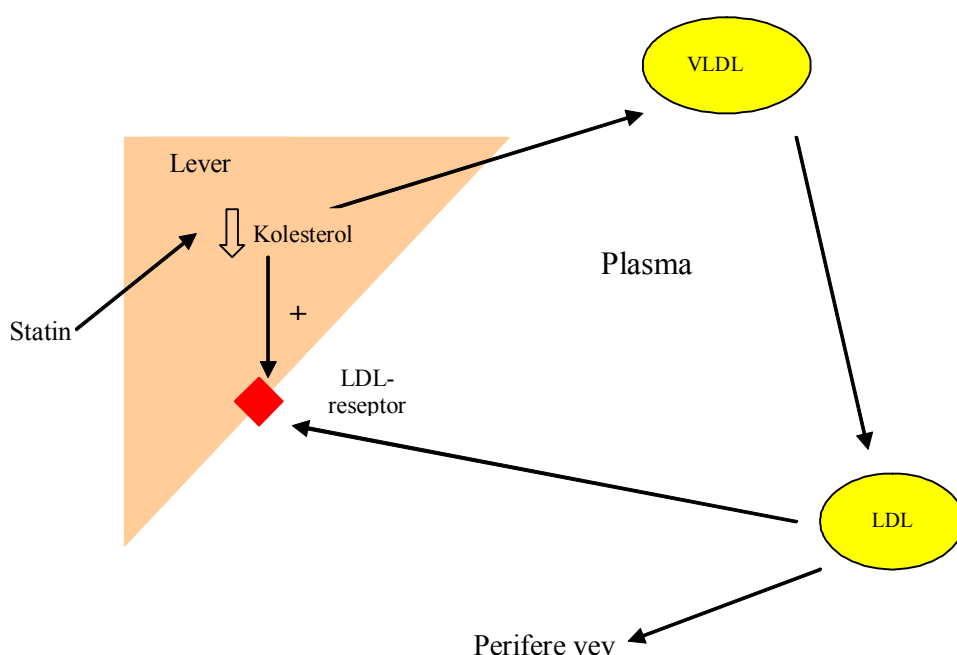


Atorvastatin

Figur 2. 2. generasjonsstatiner.

5.2.2 Virkningsmekanisme

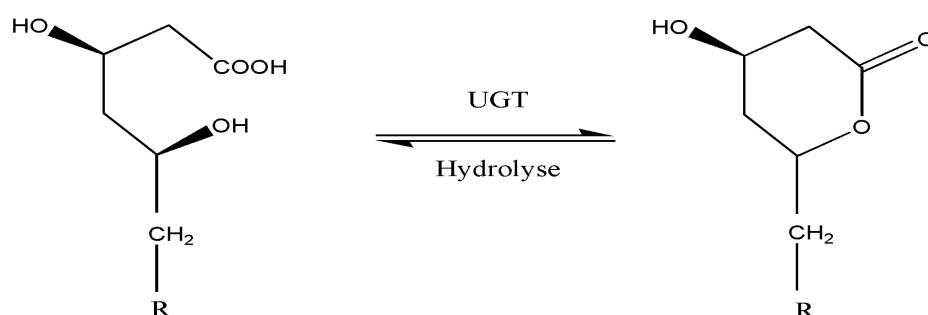
Statiner virker ved å spesifikt hemme enzymet HMG-CoA reductase som katalyserer det hastighetsbestemmende trinnet i kolesterolsyntesen, omdannelsen av HMG-CoA til mevalonsyre. Dette fører til at leverens kolesterolsyntese reduseres, hvilket medfører en oppregulering av LDL-reseptorer på leverens overflate (Figur 3). Økt antall LDL-reseptorer gir økt clearance av LDL fra systemisk sirkulasjon. *Den viktigste biokjemiske effekten av statinene vil således være å redusere plasma-LDL nivået.* Statiner vil i tillegg redusere nivået av triglyserider samt øke nivået av HDL (8).



Figur 3. Statinenes virkningsmekanisme.
Statiner hemmer dannelsen av kolesterol hvilket medfører en oppregulering av LDL-reseptorer på leverens overflate. Plasma LDL-nivået reduseres.

5.2.3 Syre-lakton likevekt

Statiner foreligger på to ulike former, syre og lakton. Under fysiologiske forhold vil statiner kunne undergå både pH-avhengig og enzymatisk konvertering. Generelt vil både syre- og laktonformen koeksistere i likevekt *in vivo*. UDP-glucuronosyl-transferase (UGT) 1A1, 1A3 og 2B7 er til dels ansvarlig for enzymatisk omdannelse av statiner fra syreform til laktonform (Figur 4) (9).



Figur 4. Enzymatisk omdannelse av statiner. R = statinmolekyl bortsett fra syre/lakton gruppen.

Det er kun syreformen som hemmer enzymet HMG-CoA reduktase. Statiner virker ved å binde seg til et spesifikt sete på HMG-CoA reduktase ved hjelp av ionebindinger. Krystallstrukturer viser tydelig at det kun er den lineære formen, syreformen, som binder seg til dette setet på enzymet. I laktonformen er disse bindingene fraværende hvilket medfører en svært svak eller ingen hemming av enzymet (10). Laktonet kan tenkes å ha andre fysiologiske effekter.

Simvastatin og lovastatin er prodrugs. Laktongruppen hydrolyseres til den korresponderende hydroksysyren etter opptak fra GI-traktus. Pravastatin, fluvastatin og atorvastatin gis på syreform. Verdiene i tabellen (Tabell 1) indikerer at både syre- og laktonform av statinene er tilstede *in vivo*, men i ulik grad, hvilket kan påvirke statinenes farmakologiske effekter (9; 11).

Tabell 1. AUC ratio for lakton/syre formene *in vivo* (9, *11).

Statin	AUC ratio
Atorvastatin	0,86
Cerivastatin	0,09
Fluvastatin	0,03*
Lovastatin	0,37
Pravastatin	0,03
Simvastatin	2,15

5.2.4 Metabolisme

Enzymkomplekset cytokrom P450 er ansvarlig for metabolismen av de aller fleste statinene. Pravastatin er unik blant statinene i denne sammenheng fordi den primært ikke blir metabolisert via cytokrom P450 komplekset (Tabell 2). Pravastatin metaboliseres ved hjelp av isomerisering, sulfatering, glutation-konjugering og oksidering (6), men skilles også ut uomdannet via nyrene i en relevant grad (12).

Tabell 2. Metabolisme av statiner (12).

Statin	Metabolisme
Atorvastatin	CYP 3A4
Cerivastatin	CYP 3A4/2C8
Fluvastatin	CYP 2C9
Lovastatin	CYP 3A4
Pravastatin	Metaboliseres i lever uavhengig av CYP 450
Simvastatin	CYP 3A4/3A5

CYP-enzymene omdanner lipofile substanser til mer hydrofile substanser. Affiniteten til CYP-enzymene avhenger til dels av substansens lipofilisitet, lipofile substanser vil binde seg i større grad enn hydrofile substanser (9). Dette kan delvis forklare hvorfor den i mindre grad lipofile pravastatin hovedsaklig ikke metaboliseres via CYP 450 komplekset.

5.2.5 Lipofilisitet

Det har vært postulert at lipofile statiner er mer myotoksiske enn hydrofile statiner på grunn av økt penetrasjon inn i muskelcellene (6). *In vitro* studier viser at pravastatin, som er relativt hydrofil, har dårlig penetrasjon over muskelcellemembranen. Risikoen for utvikling av myopati er lav for pravastatin noe som i hvert fall til dels kan skyldes dens hydrofile egenskaper (Tabell 3) samt minimal metabolisme via CYP 3A4 (13). Til tross for dette, er det ellers liten sammenheng mellom grad av lipofilisitet av statinet og klinisk signifikant myopati hos pasienter (6). *In vitro* resultater viser at forskjell i lipofilisitet mellom de ulike statinene ikke alene kan forklare forskjellen sett i myotoksisk potensial. Statinets laktonform er mer lipofil enn tilsvarende syreform (Tabell 3), *in vitro* data viser at statin på laktonform er mer myotoksisk enn korresponderende syreform (14).

Tabell 3. Log P verdier (9).

Statin	Log P
Atorvastatin, syre	5,05
Atorvastatin, lakton	5,58
Fluvastatin, syre	3,79
Fluvastatin, lakton	4,32
Lovastatin, syre	3,15
Lovastatin, lakton	3,68
Pravastatin, syre	1,69
Pravastatin, lakton	2,23
Simvastatin, syre	3,85
Simvastatin, lakton	4,39

5.2.6 Interaksjoner

Siden dyslipidemi er en kronisk tilstand vil bruken av lipidsenkende medikamenter ofte være en livslang behandling. Kombinasjoner med andre legemidler vil derfor i mange tilfeller være aktuelt. Ulike kombinasjoner kan gi opphav til uheldige interaksjoner av mer eller mindre alvorlig grad. Interaksjonene dreier seg hovedsakelig om legemidler som metaboliseres via CYP 3A4. Oftest vil dette føre til økt eksponering av de aktuelle statinene, noe som kan øke risikoen for bivirkninger. De fleste statinene har lav biologisk tilgjengelighet på grunn av omfattende presystemisk metabolisme i tarm og lever (12). Ved samtidig bruk av medikamenter som hemmer metabolismen av statinene vil den biologiske tilgjengeligheten øke kraftig. Økningen blir naturlig nok størst for de statinene som har den laveste biotilgjengeligheten (12).

Insidensen av rabdomyolyse (Tabell 4) ved statin monoterapi er cirka 0,04-0,2 % (15). Risikoen for rabdomyolyse øker ved økende serumkonsentrasjon, det vil si at det er en doseavhengig effekt (15). Over halvparten av alle tilfellene av statinindusert rabdomyolyse mistenkes å være forårsaket av en legemiddelinteraksjon. Dette er hyppigst beskrevet for mibefradil (16 %), fibrater (13 %), cyklosporin (8-30 %), makrolider (7 %), warfarin (5 %), digoxin (4 %), azoler (2 %), nikotinsyre og diltiazem (15). En annen kilde oppgir insidensen av myopati ved statin monoterapi til 0,12 %, mens den ved samtidig bruk av interagerende legemidler er 0,22 % (13). Risikoen for hospitalisering grunnet myopati forårsaket av et lipidsenkende medikament økte med en faktor på seks ved samtidig administrasjon av en CYP 3A4 hemmer (16).

Tabell 4. Insidens av rabdomyolyse (15).

Statin	Insidens av rabdomyolyse (%)
Simvastatin	36
Cerivastatin	32
Atorvastatin	12
Pravastatin	12
Lovastatin	7
Fluvastatin	2

5.2.7 Bivirkninger

Statiner tolereres vanligvis godt. Milde bivirkninger som kan oppstå er gastrointestinale forstyrrelser, levertoksisitet, søvnløshet og utslett (8). De mest vanlige bivirkningene omfatter skjelettmuskulaturen i mer eller mindre alvorlig grad. Insidensen i litteraturen varierer fra 1-7 %, myalgi er den mest frekvente muskelbivirkningen (6). Sannsynligvis er denne insidens mye høyere i klinisk hverdag noe personlig kommunikasjon med lipidklinikken (Rikshospitalet) og også den nylig publiserte PRIMO-studien viste (17).

5.3 Muskelbivirkninger av HMG-CoA reductase hemmere (statiner)

5.3.1 Skjelettmuskulatur

Muskelceller er svært spesialiserte for å kunne kontrahere raskt og effektivt. Muskelfibre er store celler som er dannet ved sammensmelting av flere mindre celler. Flere kjerner vil således inngå i de enkelte muskelfibrene. Størstedelen av cytoplasma i disse muskelfibrene består av myofibriller som er den minste kontraktile enheten (18).

Skjelettmuskulaturen utgjør 45 % av den totale kroppsvekten og har høy metabolsk aktivitet og rik blodtilførsel. Dette fører til at skjelettmuskulaturen er kraftig eksponert for eventuelle legemidler i systemisk sirkulasjon. Muskeltoksisiteten til et legemiddel kan derfor være relatert til en høy plasmakonsentrasjon (6). Ulike vevskonsentrasjoner av statiner er ikke kjent (19).

5.3.2 Klassifisering av statininduserte muskelbivirkninger

Muskeltoksisitet var en av de første, klinisk observerte bivirkninger av statiner (6). Statininduserte muskelbivirkninger kan klinisk inndeles i fire grupper; myopati, myalgi, myosititt og rabdomyolyse (15).

Myopati er en generell betegnelse på alle sykdommer som omfatter muskulaturen. Myopati kan være arvelig eller tilegnet, og kan oppstå i alle aldre (20).

Myalgi er en tilstand som utarter seg i form av diffuse muskelsmerter, muskelømheter og/eller muskelsvakhet. Kreatin kinase (CK) nivåene er normale (20).

Myosititt er en inflammatorisk sykdom i muskulatur, med eller uten CK økning. En biopsi vil avdekke nekrotisk vev og infiltrasjon av inflammatoriske celler (6).

Rabdomyolyse er et klinisk og biokjemisk syndrom som oppstår fordi plasmamembranen til muskelcellene skades slik at potensielt toksiske muskelcelle-komponenter lekker ut til systemisk sirkulasjon. Disse komponentene er blant annet myoglobin, CK, kalium, hydrogenioner og fosfat (21). CK nivåene er ofte 10 ganger over den øvre normale grensen (20). Pasienten opplever muskelsmerter, ømhet og kramper. Myoglobin, skilt ut fra muskelcellene, vil ved et tilstrekkelig høyt plasmanivå skilles ut med urinen og farge den mørk, myoglobinuri (6).

Rabdomyolyse kan klassifiseres i tre grupper (6);

- anstrengelsesutløst
- arvelig (skyldes defekt i enzymkapasiteten)
- ikke-arvelig (kan skyldes alkoholisme, mangel på fosfat, toksiner, iskemi eller legemidler, deriblant statiner)

Rabdomyolyse kan føre til akutt nyresvikt og i verste fall død. Myoglobin hemmer dannelsen av nitrogenoksid og kan dermed føre til intrarenal vasokonstriksjon og iskemi. Tilstanden kompliseres ytterligere av hypovolemi og metabolsk acidose som skyldes at fosfat, sulfat, urinsyre og melkesyre skilles ut fra muskelcellene. Andre komplikasjoner som kan oppstå er intravaskulær koagulasjon, kardiomyopati og respirasjonssvikt. Behandlingen består i å forhindre nyresvikt ved å gi intravenøs væsketilførsel, samt å alkalinisere urinen ved hjelp av natriumbikarbonat-infusjon (6). Det er viktig å fremme diurese for å hindre utfelling av myoglobin (21). Elektrolytt balansen må også justeres.

Rabdomyolyse har en dødelighet på 7,8 % (15). Om lag 25 % av pasientene med tilbakevendende rabdomyolyse har en defekt i enzymkapasiteten (mangel på myofosforylase, fosfofruktokinase, laktat dehydrogenase eller fosfoglyseratkinase) og dermed økt risiko for rabdomyolyse ved eksponering for statiner (6).

5.3.3 Mulige mekanismer bak statinindusert muskeltoksisitet

Patofysiologien bak statininduserte muskelbivirkninger er foreløpig lite kjent. Initielt trodde man at reduserte nivåer av kolesterol i plasmamembranen til muskelcellene og dermed endret fluiditet var årsaken til bivirkningene. Senere har det vist seg at denne teorien sannsynligvis er feil. Squalen er forløperen til kolesterol, og det er vist at squalen-syntetasehemmere ikke har den samme muskeltoksisiteten, hvilket utelukker reduserte nivåer av kolesterol i plasmamembranen som årsak til muskeltoksisiteten (22).

Toksisitet forårsaket av en fremmed kjemisk forbindelse skyldes i de aller fleste tilfeller en interaksjon med en eller flere cellulære komponenter slik at visse cellulære funksjoner endres, hvilket igjen fører til enten dysfunksjon eller destruksjon av cellen (23). Det må eksistere metabolske prosesser som påvirkes av statiner på en slik måte at muskelceller skades. Preeksisterende molekyllære defekter i disse synteseveiene kan øke risikoen for statinindusert myopati (5). Det er beskrevet flere mulige mekanismer bak muskeltoksisiteten (6; 22; 24) og disse er:

- Redusert dannelselse av terpenener
- Forstyrrelse i cellens ione kanaler og intracellulær kontroll av ionehomøostase
- Svekket ATP syntese

Det er ikke fullstendig klarlagt om statinindusert muskeltoksisitet skyldes apoptose eller nekrose (25). Apoptose er en form for kontrollert, programmert celledød som aktiveres via intracellulære mekanismer. Dette fører til fragmentering av DNA, membranendringer og at cellen tilslutt krymper inn uten å skade nærliggende celler. Dette er et normalt fenomen som opptrer svært ofte i multicellulære organismer. Celler som dør på grunn av akutt skade vil typisk swelle for deretter å sprekke. Cellens intracellulære komponenter vil lekke ut og skade nærliggende celler. Dette kalles nekrose og kan gi opphav til potensielt skadelige inflammatoriske responser (18).

Redusert dannelse av terpen

Det er sannsynlig at de toksiske effektene av statinene er forårsaket av en forstyrrelse i mevalonat-metabolismen og dermed i muskelcellenes terpensyntese. En reduksjon i terpensyntesen kan ikke alene forklare myotoksisiteten. Toksisiteten må knyttes opp mot funksjonen terpenene har intracellulært (se figur 5, side 24). Terpenene benyttes intracellulært blant annet for å prenylere en rekke proteiner. Protein-prenylering vil si at man benytter seg av farnesylpyrofosfat (FPP) og geranylgeranylpyrofosfat (GGPP) for å modifisere proteiner ved å kovalent feste på en isoprenoidgruppe (18). Denne modifiseringen er viktig for den intracellulære signaleringen og proteinenes funksjon for øvrig (13). Prosessen svekkes ved reduserte nivåer av terpen, og dette kan påvirke inntil 2 % av menneskelige, cellulære proteiner. Et eksempel er lamina i den indre kjernemembranen som modifiseres ved farnesylering. Et annet eksempel er G-proteiner som også modifiseres ved prenylering. Hvilket prenylert protein som spiller den viktigste rollen er foreløpig ikke kjent (22), men de cytoskjelettassosierte Rho proteinene nevnes som de mest sannsynlige (26).

Statiner påvirker selenoproteinsyntesen ved å hemme modifiseringen, nærmere bestemt isopentenyleringen, av selenocystein tRNA (sec-tRNA). Sec-tRNA setter inn selenocystein på selenopeptider, og regulerer dermed ekspresjonen av alle selenoproteiner. Et eksempel er Selenoprotein N som spiller en viktig rolle ved myogenese og myoregenerering. Til sammenlikning kan det nevnes at selenmangel også har vist seg å kunne gi muskelbivirkninger (22).

Dolicholer er derivater, polyprenoler, av FPP og IPP. Dolicholer er lokalisert i ER-membranen hvor de spiller en viktig rolle ved dannelse av glykoproteiner. Dolicholer fungerer som bærere av oligosakkarider som overføres til aminogrupper i asparagin under dannelse av glykoproteiner. Denne glykosyleringen kan tenkes hemmet når nivået av dolicholer blir for lavt grunnet svekket syntese av terpen (22).

Redusert dannelse av Co-enzym Q 10, som dannes fra GGPP, kan også være en årsak til myopati (22). Co-enzym Q 10 benyttes i elektrontransportkjeden i mitokondriene som en mobil elektron-bærer. Reduserte nivåer vil føre til svekket ATP syntese (6).

Forstyrrelse i cellens ionekanaler og intracellulær kontroll av ioneomøostase

Ca^{2+} fungerer som et intracellulært signalmolekyl fordi konsentrasjonen i cytosol normalt er veldig lav, 10^{-7} M, mens konsentrasjonen ekstracellulært, i endoplasmatisk retikulum (ER) og i sarkoplasmatiske retikulum (SR) er betydelig høyere, 10^{-3} M. Det er således en stor gradient for influks av kalsium over både ER/SR membranen og plasmamembranen. Når et signal åpner Ca^{2+} kanaler i en av disse membranene vil Ca^{2+} strømme inn i cytosol og aktivere Ca^{2+} -følsomme proteiner i cellen, blant annet proteasen calpain. Kalsiumnivået i cytosol holdes lavt ved at kalsium pumpes ut fra cellen over plasmamembranen eller inn i ER, SR og mitokondriet (18). I muskelfibre lagres Ca^{2+} hovedsakelig i SR (27).

Statiner øker den intracellulære konsentrasjonen av kalsium, ved å blant annet forårsake Ca^{2+} effluks fra intracellulære lagringsorganer (27). Dette påvirker cellenes eksitabilitet ved at terskelen for mekanisk aktivering av skjelettmuskelfibre senkes. Disse resultatene tyder på at Ca^{2+} -homøostasen endres slik at kramper, myalgi og andre muskelbivirkninger kan oppstå (27).

Membranlipider er i dynamisk likevekt med plasmalipider. En lav plasmakonsentrasjon av kolesterol kombinert med reduserte intracellulære nivåer av kolesterol vil kunne føre til redusert lipidinnhold i plasmamembranen. En slik endring i lipidsammensetningen i plasmamembranen vil kunne gi endringer i membranens Na^+/K^+ ionekanaler og således føre til irreversibel celledød (6).

Andre mekanismer

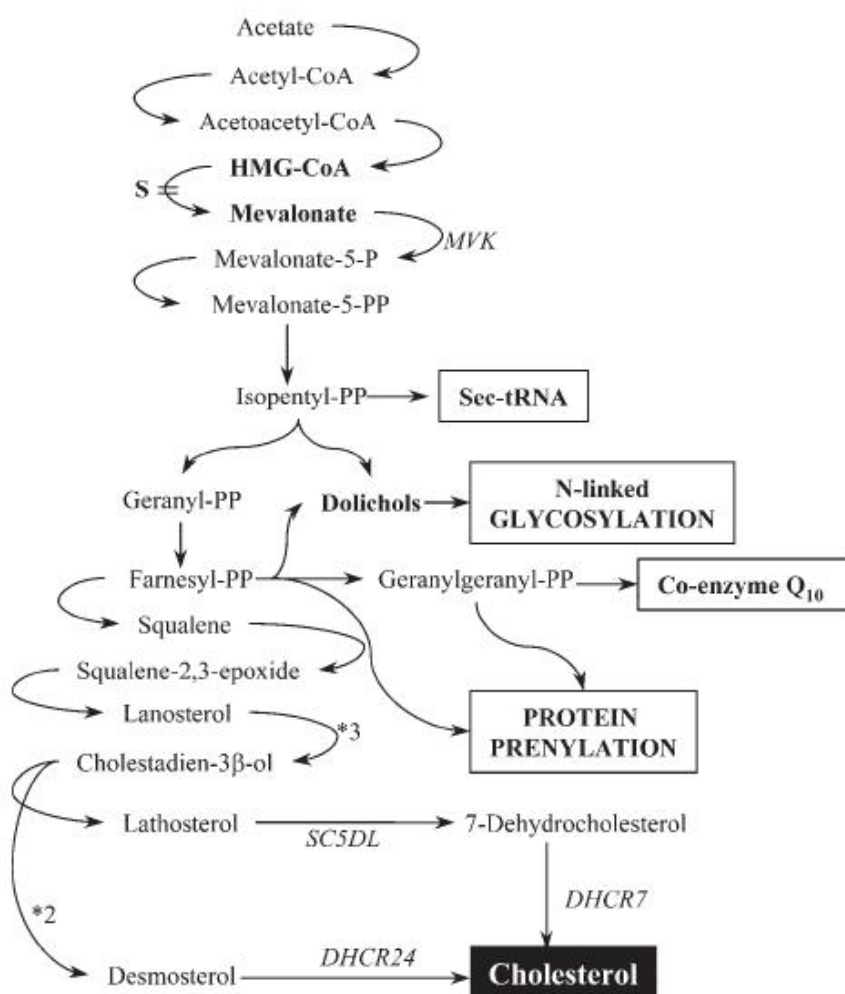
Kreatin kinase danner ATP i muskelceller ved å fosforilere ADP. Ved akutt muskelnekrose, som sees ved rabdomyolyse, lekker kreatin kinase ut fra muskelcellene slik at ATP syntesen svekkes. Intracellulære ATP lagre tømmes raskt og integriteten til cellen ødelegges (6). Når ATP nivået i cellen synker under 10 % av normal verdi, vil cellen dø av nekrose (23).

Laktonets toksiske potensial i forhold til korresponderende syreform

Statinenes syre- og laktonform har ulike farmakodynamiske og farmakokinetiske egenskaper. Det kan derfor tenkes at de i ulik grad påvirker mekanismen bak statinindusert muskeltoksisitet. En redusert dannelse av terpenener er en direkte effekt av statinenes virkningsmekanisme, mediert av syreformen. En forstyrrelse i cellens ionehomøostase kan skyldes statinets effekt på intracellulære Ca^{2+} -lagringsorganer. Laktonet vil lettere penetrere over plasmamembranen ved passiv diffusjon, og det er sannsynlig at denne effekten hovedsaklig medieres av laktonformen. En annen mulig teori er at statin på laktonform penetrerer over plasmamembranen, men konverterer til syreform intracellulært som så utøver den toksiske effekten.

5.3.4 Hemming av statinindusert muskeltoksisitet med mevalonat

Mevalonat eksisterer på både syre- og laktonform og er utgangsstoff for blant annet terpener og kolesterol (Figur 5). Ved å hemme HMG-CoA reduktase, vil statinets syreform undertrykke syntesen av både mevalonat og alle nedstrøms produkter som terpener, kolesterol og ubiquinone (25). Statinindusert muskeltoksisitet kan derfor tenkes hemmet ved tilsetning av mevalonat, hvilket denne *in vitro* modellen skal teste ut.

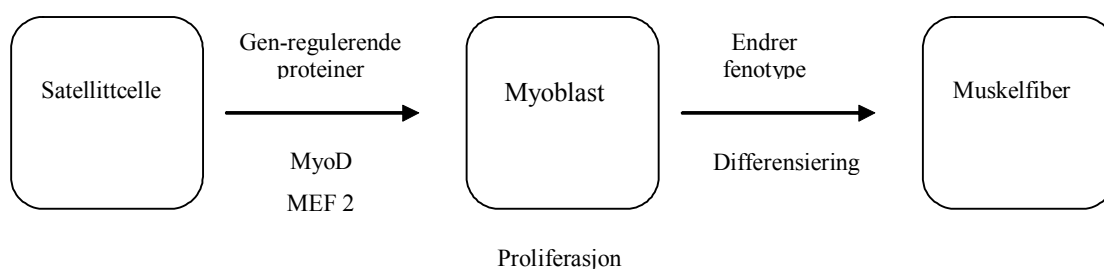


Figur 5. Syntesevei for isoprenoider og kolesterol. Statiner undertrykker syntesen av både kolesterol og isoprenoider, hvilket påvirker en rekke cellulære prosesser (22).

Det er tidligere vist at statinindusert apoptose delvis kan forhindres ved tilsetning av mevalonat (24). Andre forsøk har vist at muskelfibre som ble inkubert med GGPP, FPP eller mevalonat, forut for statinbehandling, ikke førte til en redusert statinindusert økning i intracellulært Ca^{2+} nivå (27).

5.3.5 Genetiske risikofaktorer assosiert med statinindusert myopati

Ved normal muskelvekst vil myoblaster, som stammer fra satellittceller, proliferere og danne muskelfibre under påvirkning av en rekke gen-regulerende proteiner, blant annet transkripsjonsfaktorene MyoD og MEF 2 (Figur 6). Denne endringen i fenotype skyldes endret aktivitet i muskelspesifikke gener (18). Satellittceller fra pasienter med påviste statininduserte muskelbivirkninger kan ha en annerledes genotype som under utvikling til muskelfibre gir utslag i en annen fenotype sammenliknet med satellittceller fra friske frivillige. En annerledes fenotype hos muskelfibre fra pasienter med påviste statininduserte muskelbivirkninger kan muligens gjøre de mer følsomme for statin på syre- eller laktonform, hvilket skal testes ut med en *in vitro* modell i denne oppgaven. Det er vist at en genetisk predisposisjon kan spille en signifikant rolle ved utvikling av statin relaterte muskelsymptomer (5).



Figur 6. Myogenese av skjelettmuskulatur.

Det er rapportert en høyere prevalens av underliggende metabolske muskelsykdommer hos pasienter med legemiddelinduserte myopatier sammenliknet med den generelle befolkningen. Det kan derfor synes at en kombinasjon av statinterapi med en samtidig underliggende genetisk predisposisjon kan trigge frem uønskede muskelsymptomer hos denne høyrisikogruppen (28).

Mutasjonsanalyse:

En mutasjonsanalyse har vist hvilke mutasjoner som gir de mest vanlige metabolske myopatiene. Disse mutasjonene forårsaker:

- Carnitine palmitoyltransferase (CPT) II mangel
- Myofosforylase mangel (McArdle disease)
- Myoadenylat deaminase mangel

Mutasjoner i CPT II genet forårsaker CPT II mangel (29). Carnitine palmitoyltransferase er et transferase enzym som katalyserer transporten av lange fettsyrer mellom Co-enzym A og carnitine i mitokondriematriks. Mangel på carnitine palmitoyltransferase fører til en forstyrrelse i lipid oksidasjonen. Dette fører til muskeltretthet og myoglobinuri (30).

Mutasjoner i PYGM (myofosforylase gen) forårsaker myofosforylase mangel (29). Myofosforylase er muskel-isoenzymet av glykogen fosforylase. Dette enzymet mobiliserer glukose fra glykogenlagre i muskelvev (30).

Mutasjoner i AMPD1 (myoadenylat deaminase gen) forårsaker myoadenylat deaminase mangel (29). Myoadenylat deaminase er muskel isoenzymet av AMP deaminase. Myoadenylat deaminase er tilstede i store mengder i muskelvev. Dette enzymet er hovedkilden til ammoniumioner som trengs ved muskelkontraksjon. Mangel på dette enzymet fører til muskeltretthet ved fysisk anstrengelse (30).

Data viser at 10 % av pasienter på lipidsenkende behandling, hovedsakelig statiner, har mutasjoner som forårsaker en av de tre metabolske myopatier beskrevet ovenfor (29). Bærerfrekvensen for McArdle disease var 20 ganger høyere hos pasienter med statininduserte myopatier sammenliknet med den generelle befolkningen. Retningslinjer for screening av individer for en mulig underliggende metabolsk forstyrrelse kan være nyttig når statinterapi vurderes eller hos pasienter som opplever muskelbivirkninger ved oppstart av statinterapi. Mutasjonsscreening for McArdle disease, CPT II mangel og myoadenylat deaminase mangel er også anbefalt for symptomatiske pasienter og pasienter med CK nivå fire ganger over normalt nivå (29).

Genetisk defekt ved den intracellulære kalsiumhomøostasen:

Det er påvist en unormal muskelkontraksjon hos pasienter med statinindusert myalgi og rabdomyolyse. Dette kan være et tegn på endret kalsiumhomøostase siden kalsium spiller en viktig rolle ved muskelkontraksjon. Mutasjoner i RYR1, genet som koder for ryanodin reseptoren i SR, og i CACNA1S, genet som koder for dihydropyridin reseptoren, er funnet hos pasienter med alvorlige statininduserte muskelbivirkninger (28). Begge disse genene er nært involvert i kalsiumhomøostasen. Omfattende effluks av Ca^{2+} fra SR er vist ved behandling av kolesterolsenkende medikamenter, blant annet simvastatin og cerivastatin (28). Denne kalsiumlekkasjen, trigget av statiner, kan være forårsaket av en direkte effekt på ryanodin reseptoren i SR eller en endret mitokondrie funksjon. En mulighet er at en bestemt genotype av ryanodin reseptoren kan være spesielt følsom for statinterapi og dermed predisponere for myalgi eller rabdomyolyse hos disse individene. Disse observasjonene tilsier at statiner kan vekke til live latente, metabolske svakheter og dermed føre til muskelbivirkninger ved eksponering for statiner (28).

Genetisk variasjon ved CYP, Pgp og UGT:

CYP 3A4 er det viktigste isoenzymet uttrykt i human lever, dette isoenzymet står for inntil 50 % av de totale CYP proteinene i leveren (6). Det er stor interindividuell variasjon i uttrykkelsen av CYP 3A4 isoenzymet. Dårlig uttrykk av dette enzymet og dermed redusert evne til å metabolisere enkelte statiner kan føre til økt systemisk eksponering og økt risiko for muskeltoksisitet siden dette er et doseavhengig fenomen. Denne variasjonen, tildels genetisk betinget, kan være med på å forklare de store forskjellene i myotoksisitet sett mellom ulike pasienter (6). Simvastatin metaboliseres også via CYP 3A5. Også i dette tilfellet kan ulike genotyper gi opphav til ulik grad av muskeltoksisitet.

P-glykoprotein (Pgp), fungerer som en cellulær effluxpumpe som kontrollerer den intracellulære konsentrasjonen av potensielt toksiske substanser. Dette proteinet kodes av genet ABCB1 (adenosintrifosfat bindende kassett, underfamilie B1). Det er vist en sammenheng mellom ulike haplotyper av dette genet og sikkerhet ved statinterapi (31). Simvastatin og atorvastatin på syreform er substrat for Pgp, mens laktonformene hemmer Pgp i større grad enn tilsvarende syreform (31).

Genetisk polymorfisme er også rapportert for isoenzymene UGT1A1 og UGT2B7, enzymene som omdanner statiner fra syreform til laktonform. Syre- og laktonformene har ulikt interaksjonspotensiale og det vil derfor være etniske forskjeller når det gjelder interaksjoner mellom statiner og andre legemidler, og dermed ulikt potensial for muskeltoksisitet (9).

5.3.6 Risikofaktorer for utvikling av rabdomyolyse ved bruk av statin

Det er blitt identifisert flere faktorer som øker risikoen for rabdomyolyse ved samtidig bruk av statin. Disse faktorene er alder, statindose, annen medisinbruk og pasientens medisinske tilstand for øvrig. Redusert leverfunksjon og hypotyreose er eksempler på medisinske tilstander som kan føre til nedsatt metabolisme av statiner og dermed økt systemisk eksponering (16).

En undersøkelse viste at alle de 121 beskrevne tilfellene av rabdomyolyse, bortsett fra ett, forårsaket av simvastatin var assosiert med en annen risikofaktor i tillegg (16). Hele 58 % av tilfellene var assosiert med tre eller flere risikofaktorer. Færre risikofaktorer var implisert ved atorvastatinindusert rabdomyolyse.

Sammenlikninger viser at det, for simvastatin, er en sammenheng mellom økende alder og økende risiko for rabdomyolyse (16). Det er også vist at risikoen for rabdomyolyse øker med økende dose simvastatin. Alder over 70 år og en statindose over 40 mg er ansett som risikofaktorer for utvikling av rabdomyolyse (16).

Risikoen for rabdomyolyse øker med økende serumkonsentrasjon av statin (32). Faktorer som påvirker distribusjonsvolumet som kjønn og kroppsstørrelse, og faktorer som reduserer legemiddelmetabolismen som nyre og leverfunksjon, interagerende legemidler, alder, stoffskifte og diabetes vil således kunne øke den systemiske eksponeringen og øke risikoen for rabdomyolyse (32). Fysisk utfoldelse predisponerer også for utvikling av muskelbivirkninger hos pasienter på statinterapi (24).

Selv om risikofaktorer også var tilstede ved atorvastatinindusert rabdomyolyse, var influensen mindre her enn ved simvastatinindusert rabdomyolyse (16). Dette kan bety at atorvastatin er tryggere i bruk ved tilstedeværelse av andre risikofaktorer, dataene kan også bety at det er en større risiko for utvikling av rabdomyolyse ved bruk av atorvastatin ved fravær av andre risikofaktorer. Rent praktisk vil det viktigste være å minimalisere risikofaktorene, ved for eksempel å redusere statindosen ved samtidig bruk av interagerende legemidler (16).

6 PROBLEMSTILLING

Denne hovedfagsoppgaven skal ta for seg to forskjellige områder tilknyttet statininduserte muskelbivirkninger. Disse to områdene vil til en viss grad bli behandlet hver for seg i oppgaven.

Del 1: Hemming av statinindusert muskeltoksisitet ved tilsetning av mevalonat

Det skal undersøkes om det er mulig å hemme statinindusert muskeltoksisitet *in vitro* ved å tilføre mevalonat. Dersom man ser en hemming av muskeltoksisitet ved tilsetning av mevalonat, vil det videre være interessant å undersøke om denne hemmingen er avhengig av om toksisiteten er fremmet av henholdsvis syre- eller laktonform av statinet.

Del 2: Muskelceller fra pasienter med statininduserte muskelbivirkninger

Det skal undersøkes om muskelceller fra pasienter med påviste statininduserte muskelbivirkninger lar seg påvirke annerledes *in vitro* av statin i syre- eller laktonform enn muskelceller fra friske donorer.

Konkrete mål:

- ❖ Utvikle metoder for å påvise om mevalonat kan hemme muskeltoksisitet forårsaket av statiner.
- ❖ Undersøke om statinindusert muskeltoksisitet kan hemmes ved tilsetning av mevalonat.
- ❖ Undersøke om muskelceller fra pasienter med påviste statin-bivirkninger er mer mottagelige for toksisitet fra statiner på syre- eller laktonform enn muskelceller fra friske donorer.

7 MATERIALE OG METODER

7.1 Materiale

7.1.1 Cellemateriale

Friske frivillige donorer:

Muskelbiopsien ble tatt i forbindelse med at personen donerte en nyre. Muskelbiopsien ble tatt fra muskelen *obliquus internus abdominis* (skrå, indre bukmuskel).

ID	Alder	Kjønn	BMI (kg/m ²)	Legemidler
LD 10	38 år	Kvinne	22,8	-
LD 21	68 år	Kvinne	29,7	Levothyroxin, cetirizin, zopiclone, vitaplex
LD 32	34 år	Kvinne	22,3	-
LD 34	36 år	Kvinne	19,1	-
LD 36	41 år	Kvinne	20,3	-

Forkortelser: LD = levende donor, BMI = "Body mass index"

Pasienter med påviste statin-bivirkninger:

Muskelbiopsien ble tatt fra lårmuskelen *vastus lateralis* i forbindelse med klinisk utredning.

ID	Alder	Kjønn	BMI (kg/m ²)	Sykdommer	Muskel biopsi*	Beskrivelse av bivirkninger	Lipid-senkende behandling	Andre Legemidler
AMD3	56 år	Mann	30,7	Søvnapne	Normal	Smerter og stivhet i muskel og ledd, hodepine, tretthet, utmattelse	Omega-3, ezetimib, colesvelam, simvastatin, atorvastatin, pravastatin, fluvastatin	Acetyl-salicylsyre, mometason (nesespray)
AMD4	50 år	Mann	26,0	Ingen	Normal	Stivhet, leddsmerter	Atorvastatin, simvastatin	
AMD5	63 år	Mann	23,5	Borreliose, muskelpager	Atrofi	Smerter og stivhet i hele kroppen	Pravastatin, atorvastatin, ezetimib	Nifedipin, diclofenac, paracetamol+ kodein
AMD6	45 år	Mann	27,3	Mitokondriopati	Normal	Muskel-smerter ved fysisk anstrengelse	Atorvastatin	Clonazepam, beklometason (nesespray)

Forkortelser: AMD = Atorvastatin muskeldonor, BMI = "Body mass index"

*Undersøkt ved bruk av elektronmikroskopi (detaljer vedrørende undersøkelsen foreligger ikke)

7.2 Metoder

7.2.1 Satellittcelle isolering

Muskelbiopsien ble oppbevart i DMEM m/Glutamax-1 uten FCS før den ble overført til en petriskål. Fettvev og bindevev ble fjernet og biopsien ble kuttet opp i små biter som ble overført til et sentrifugerør med DMEM m/Glutamax-1. Etter 20 minutter ble mediet sugd av og trypsin ble tilsatt. Trypsineringen ble gjentatt 2 ganger. Væsken over vevet fra de tre trypsineringene ble samlet sammen og satt i inkubator ved 37 °C i 30 minutter for å fjerne fibroblaster. Mediet ble deretter sugd av og sådd ut på skåler eller flasker coated med ECM.

7.2.2 Coating av 12 brønners plater

Satellittceller ble sådd ut og dyrket på 12-brønners plater. Platene ble på forhånd coated med ECM løsning slik at cellene kunne feste seg til bunnen av brønnen. Dette ble gjort ved at ECM gel (Product No. E 1270) fra musesarkoma ble fortynnet i DMEM m/Glutamax-1 i forholdet 5:75, eksempelvis 5 ml ECM gel i 70 ml DMEM m/Glutamax. Ved coating ble ECM-blandingen fortynnet ytterligere med DMEM m/Glutamax-1 i forholdet 1:5, eksempelvis 0,5 ml ECM-blanding og 2 ml DMEM m/Glutamax-1. Coatingen foregikk ved at den fortynnete ECM-blandingen ble tilsatt hver enkelt brønn for deretter å bli sugd opp ved hjelp av en pipette. ECM løsningen dannet en tynn film, i form av et grått sjikt, på bunnen av hver brønn. Platene var nå klare til utsåing av satellittceller.

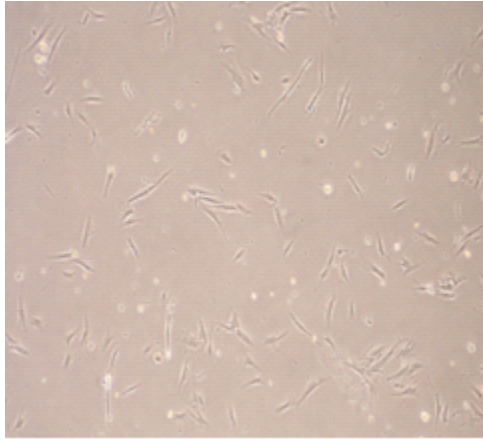
7.2.3 Utsåing av satellittceller

Satellittcellene ble oppbevart i en tank med flytende nitrogen. Straks røret med celler ble hentet ut fra nitrogentanken ble korken skrudd forsiktig opp for å utlikne trykket. Røret med celler ble tint raskt, men forsiktig, i 37 graders varmt vann. Etter tining ble cellesuspensjonen overført til et 50 ml sentrifugerør. 5 ml DMEM m/Glutamax-1 ble tilsatt dråpevis. Cellesuspensjonen ble sentrifugert ved 1800 rpm i 7 minutter. Cellene dannet en liten pellet og supernatanten inneholdende toksisk DMSO ble sugd av ved hjelp av en pasteur-pipette tilkoblet sug. Cellepelletten ble resuspendert først i 1 ml utsåingsmedium for å få cellene jevnt fordelt, deretter i passe volum etter hva som var nødvendig til utsåing. Det ble tilsatt 0,5 ml

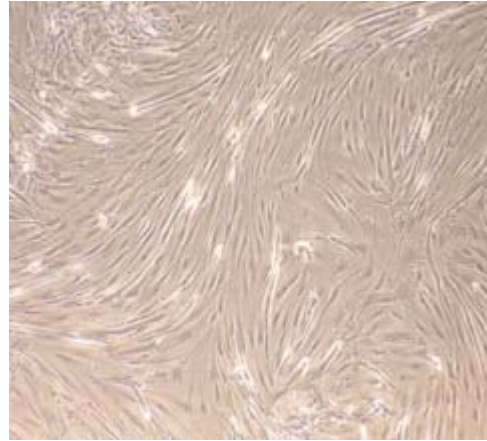
cellesuspensjon til hver brønn. Før hvert uttak fra sentrifugerøret ble røret vendt svært forsiktig. Selve utsåingen fra pipetten foregikk relativt raskt for å sikre en jevn fordeling av cellene. Tilslutt ble det tilsatt ytterligere 0,5 ml utsåingsmedium til hver brønn. Platene ble merket med type donor, generasjon, utsåingsdato og navn. Cellene ble satt til dyrking ved 37 grader og 5 % CO₂.

7.2.4 Proliferasjon av satellittceller og differensiering til muskelfibre

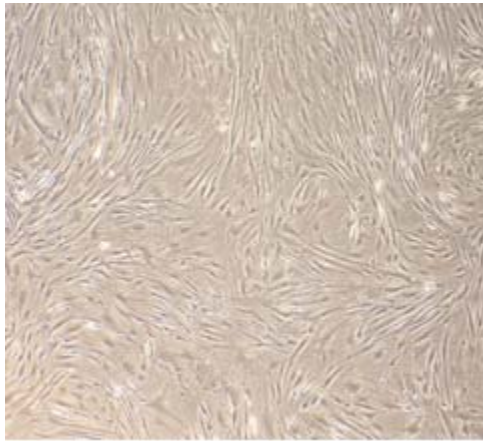
Etter 24 timers inkubasjon ble det byttet fra utsåingsmedium til proliferasjonsmedium, 0,5 ml til hver brønn. Proliferasjonsmediet ble skiftet hver 3. dag til cellene nådde omtrent 70 % konfluens. Normalt skjedde dette etter en uke. Deretter ble det byttet til differensieringsmedium. Muskelcellene begynte da å danne muskelfibre. Differensieringen tok omtrent 8 dager. Totalt sett gikk det således 15 dager fra cellene ble sådd ut til forsøket ble utført. Cellene ble visuelt undersøkt i mikroskop gjennom proliferasjon og differensiering, det ble også tatt bilder av cellene (Figur 7) for å dokumentere utseende og vekst.



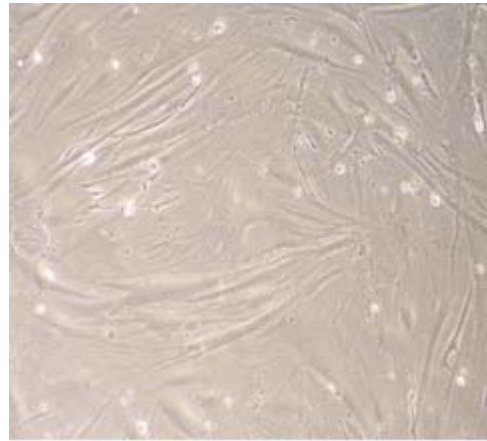
Dagen etter utsåing



Etter proliferasjon



Differensieringsdagen



3. differensieringsdag

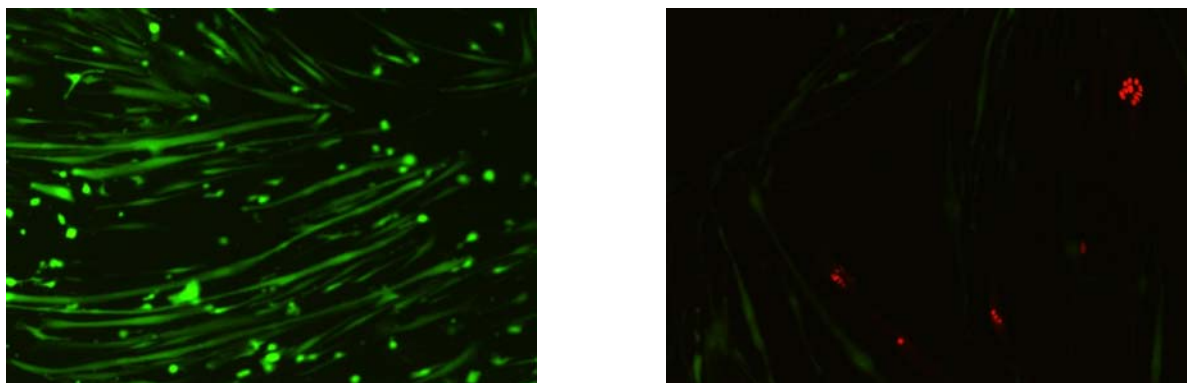
Figur 7. Humane muskelceller ved ulike vekst- og differensieringsstadier.

7.2.5 Inkubering med statin og eventuelt mevalonat

Muskelcellene ble inkubert med økende konsentrasjoner statin, og eventuelt mevalonat, i inntil 72 timer. Simvastatin og atorvastatin ble løst opp i DMSO, mens mevalonat ble løst opp i henholdsvis buffer eller sterilt vann. En oppløsning med statin og eventuelt mevalonat ble tilsatt brønnen direkte sammen med nytt differensieringsmedium. Kontrollen ble tilsatt DMSO og eventuelt sterilt vann eller buffer avhengig av type forsøk slik at konsentrasjonen av løsningsmidlet i kontrollen var den samme som i prøven med den høyeste statinkonsentrasjonen. Deretter ble cellene satt til inkubering i inntil 72 timer.

7.2.6 Måling av statinindusert celledød

Etter inkubering med statin og eventuelt mevalonat ble cellene studert i mikroskop for å få et visuelt inntrykk av statinets og eventuelt mevalonats effekt på cellene. Deretter ble cellene satt på is. Differensieringsmediet med statin og eventuelt mevalonat ble sugd av og 0,5 ml iskald PBS ble tilsatt hver enkelt brønn. PBS ble sugd av og nye 0,5 ml PBS ble tilsatt, dette for å vaske bort eventuelle rester av mediet. PBS ble igjen sugd av og 0,5 ml PI/FdA blanding ble tilsatt hver enkelt brønn. Fargingen tok tre minutter og platen ble i mellomtiden dekket til med aluminiumsfolie. Etter tre minutter ble PI/FdA blandingen sugd av og platene ble vasket med iskald PBS to ganger for å fjerne rester av PI/FdA blandingen. Tilslutt ble det tilsatt nøyaktig 0,5 ml PBS. FdA krysser cellemembranen og hydrolyseres av intracellulære esteraser under dannelse av en grønn, fluorescerende forbindelse. Skade på cellene svekker FdA fargingen, og tillater at PI penetrerer cellene. Interaksjonen mellom PI og DNAet i cellene gir en rød, fluorescerende forbindelse (26). Fluorescensbilder av cellene viste levende celler som grønne og døde celler som røde (Figur 8).



Figur 8. FdA farget levende celler grønne. PI farget døde celler røde.

Cellene ble så skrapet løs fra bunnen av brønnen med en glasstav med gummihefte, det ble skrapet i 30 sekunder i hver brønn. Etter skraping ble PBS løsningen med de avskrapte cellene overført til merkede eppendorfrør. Eppendorfrørene ble virvlet godt før 200 μ l av cellesuspensjonen i hvert eppendorfrør ble overført til en brønn på en sort 96-brønns plate. Fluorescensen ble målt på plateleser Wallac 1420 Victor 3TM. Bølgelengdene som ble benyttet var 531/615 nm for PI og 485/535 nm for FdA. Andel levende celler ble kalkulert ved å regne ut ratioen levende celler mot kontroll. Tallmaterialet ble videre behandlet i Excel[®], se forøvrig nærmere forklaring i appendiks (12.4).

7.2.7 Statistisk analyse

Hemming av statinindusert muskeltoksisitet ved tilsetning av mevalonat

Alle utprøvende forsøk ble utført med $n = 3$ (statinbehandling) eller $n = 6$ (kontroll). For å bekrefte eller avkrefte en effekt ble forsøket gjentatt to ganger slik at $n = 9$. Grafene er gitt som middelerdi av ratio \pm SD. Det ble benyttet celler fra to friske frivillige (LD 34 og LD 36).

Muskelceller fra pasienter med statininduserte muskelbivirkninger

Alle forsøk med celler fra pasienter ble utført med $n = 3$ (statinbehandling) eller $n = 6$ (kontroll). For hver av de fire pasientene (AMD 3, AMD 4, AMD 5 og AMD 6) ble det utført to paralleller, slik at $n = 6$ for hver pasient. Dataene fra de fire pasientene ble sammenliknet med data fra fire friske frivillige. Det ble benyttet celler fra LD 10 ($n = 3$), LD 21 ($n = 9$), LD 32 ($n = 3$) og LD 34 ($n = 6$). Dataene i grafene er gitt som middelerdi av ratio $\pm 2 \times$ SEM.

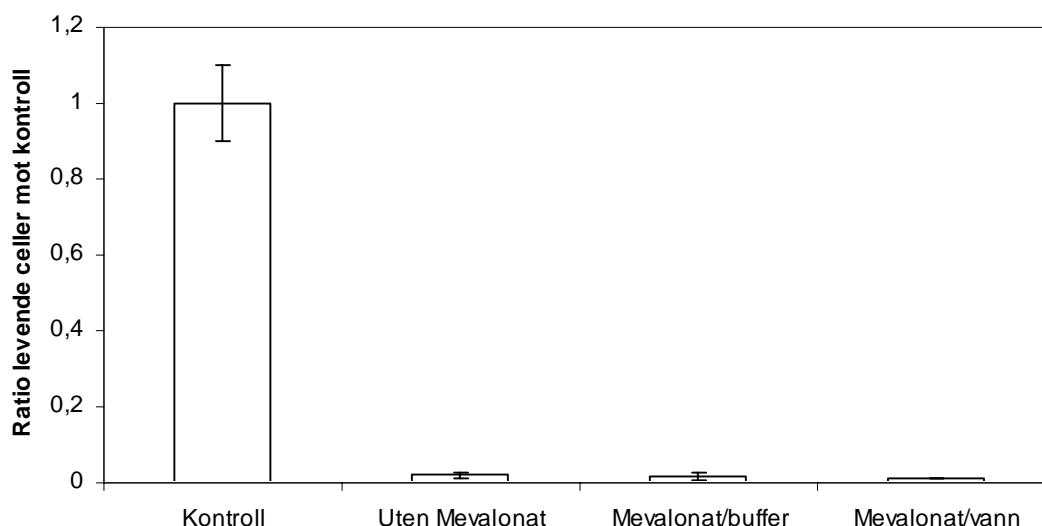
Sammenlikning av gjennomsnitt for samme behandling for de to ulike gruppene (pasient vs frisk) ble utført med en ANOVA test. Det ble testet for normalitet og det viste seg at dataene var tilnærmet normalfordelte (se appendiks). En p -verdi $< 0,05$ ble ansett som statistisk signifikant. Bonferroni korreksjon ble ikke utført.

8 RESULTATER

8.1 Hemming av statinindusert muskeltoksisitet ved tilsetning av mevalonat

8.1.1 Mevalonat løst i vann eller buffer

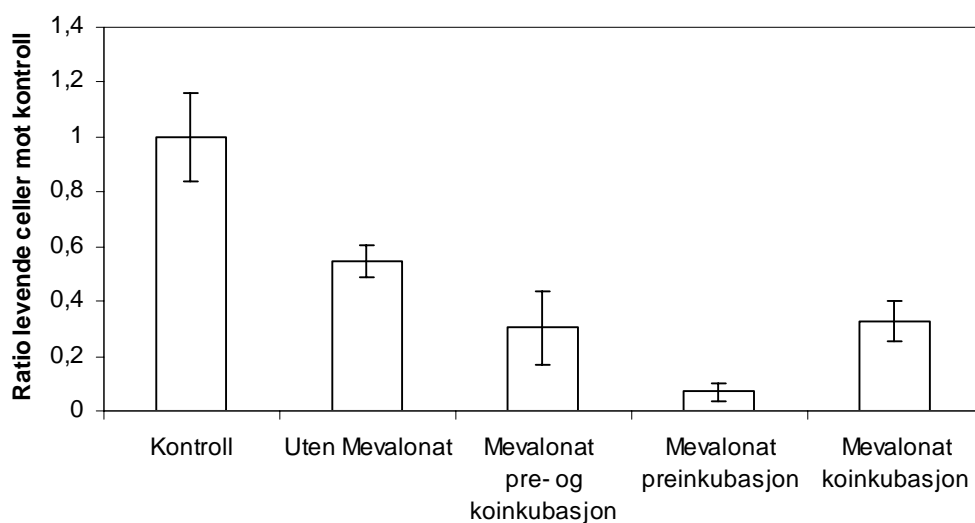
Mevalonat ble løst i henholdsvis vann og buffer (Natrium-formiat buffer pH 3,0) for å sikre at mevalonat var tilstede på laktonform ved inkubasjon og deretter tilsatt muskelcellene samtidig med simvastatin lakton 100 μM og inkubert i 12 timer ($n = 3$). Verken mevalonat løst i vann eller buffer hemmer statinindusert muskeltoksisitet i denne *in vitro* modellen (Figur 9). I de resterende forsøkene er mevalonat løst i vann.



Figur 9. Mevalonat (10 mM) løst i vann eller buffer hemmer ikke statinindusert muskeltoksisitet. Cellene ble inkubert med statin alene (uten mevalonat) eller koinkubert med mevalonat (mevalonat/buffer, mevalonat/vann) og simvastatin lakton 100 μM i 12 timer ($n = 3$). Gjennomsnitt \pm SD.

8.1.2 Pre- og/eller koinkubasjon med mevalonat

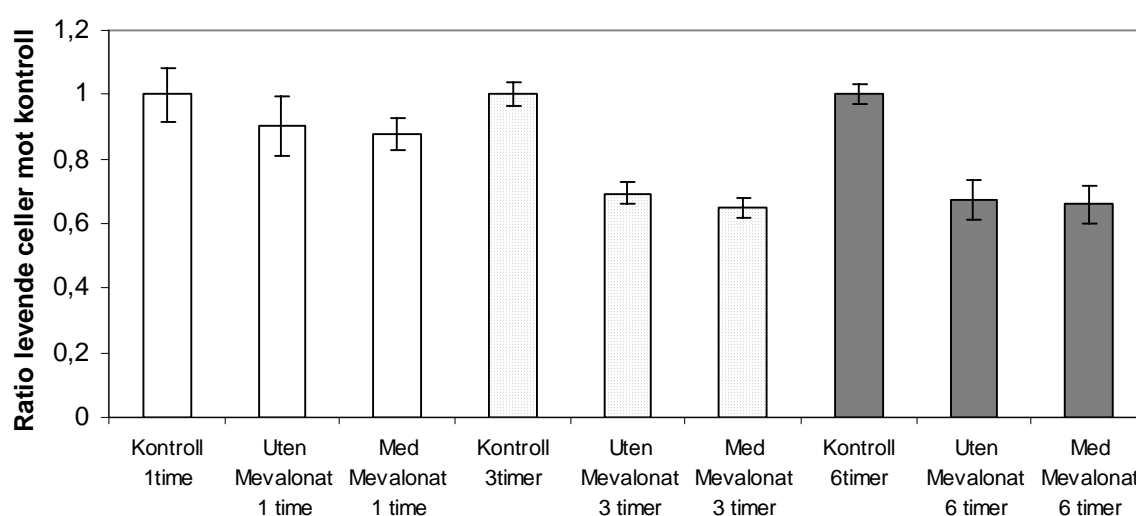
Mevalonat ble preinkubert i 12 timer, pre- og koinkubert med statinet eller kun koinkubert med simvastatin lakton 30 μ M og inkubert i 12 timer ($n = 3$). Mevalonat hemmer ikke statinindusert muskeltoksisitet i denne *in vitro* modellen verken ved preinkubasjon, pre- og koinkubasjon eller koinkubasjon alene (Figur 10). Preinkubasjon med mevalonat i 24 timer hadde heller ikke noen hemmende effekt på statinindusert muskeltoksisitet (se appendiks 12.5). I de resterende forsøkene er det kun benyttet koinkubasjon.



Figur 10. Mevalonat (10 mM) preinkubasjon (12 timer) og/eller koinkubasjon (12 timer) med simvastatin lakton 30 μ M hemmer ikke statinindusert muskeltoksisitet. Gjennomsnitt \pm SD.

8.1.3 Mevalonat tilsatt muskelfibre ved økende inkubasjonstid med statin

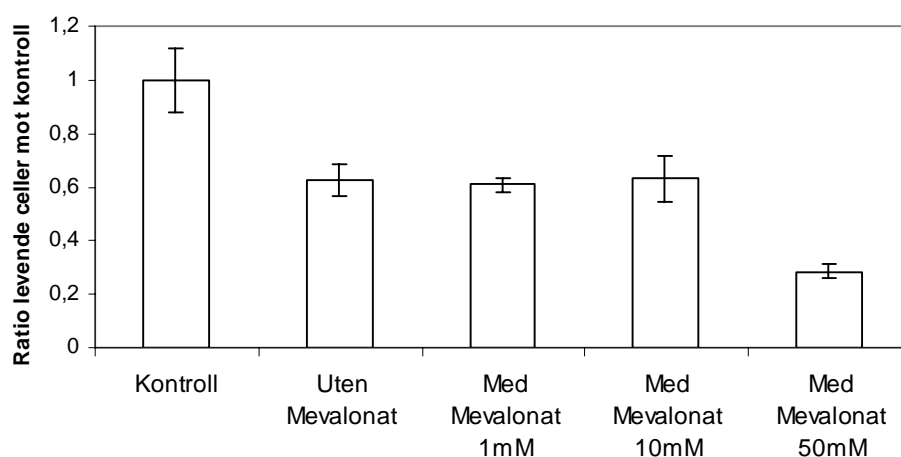
Mevalonat ble tilsatt muskelceller samtidig med atorvastatin lakton 400 μM og inkubert i henholdsvis 1, 3 og 6 timer ($n = 3$). Mevalonat hemmer ikke statinindusert muskeltoksisitet i denne *in vitro* modellen med økende inkubasjonstid (Figur 11). Liknende resultater er også vist for atorvastatin syre samt simvastatin lakton, samt ved 12 eller 24 timers koinkubasjon med statin (se appendiks 12.5).



Figur 11. Muskelfibre koinkubert med mevalonat (10 mM) og statin i henholdsvis 1, 3 og 6 timer viser at mevalonat ikke hemmer muskeltoksisitet forårsaket av atorvastatin lakton 400 μM . Gjennomsnitt \pm SD.

8.1.4 Mevalonat tilsatt muskelfibre i økende konsentrasjon

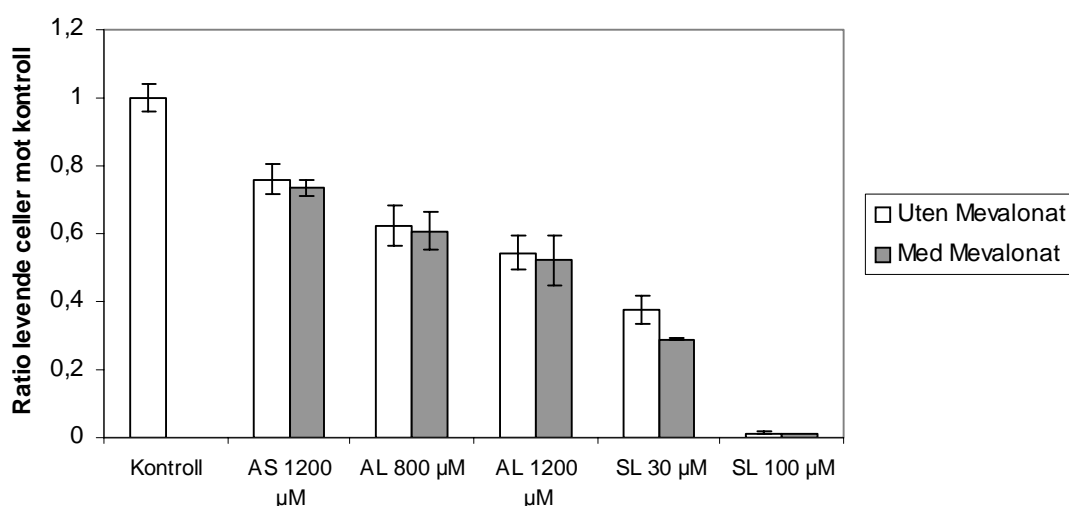
Mevalonat ble tilsatt muskelceller i konsentrasjoner på 1 mM, 10 mM eller 50 mM. Det ble benyttet koinkubasjon med atorvastatin lakton 800 μ M i 6 timer ($n = 3$). Mevalonat hemmer ikke statinindusert muskeltoksisitet i denne *in vitro* modellen verken ved 1 mM, 10 mM eller 50 mM. Økende konsentrasjon mevalonat tenderer derimot å gi økende muskeltoksisitet (Figur 12).



Figur 12. Mevalonat tilsatt muskelfibre i økende konsentrasjon (1, 10 og 50 mM) hemmer ikke muskeltoksisitet induisert av atorvastatin lakton 800 μ M. Gjennomsnitt \pm SD.

8.1.5 Effekter av mevalonat ved ulike nivåer av statinindusert myotoksisitet

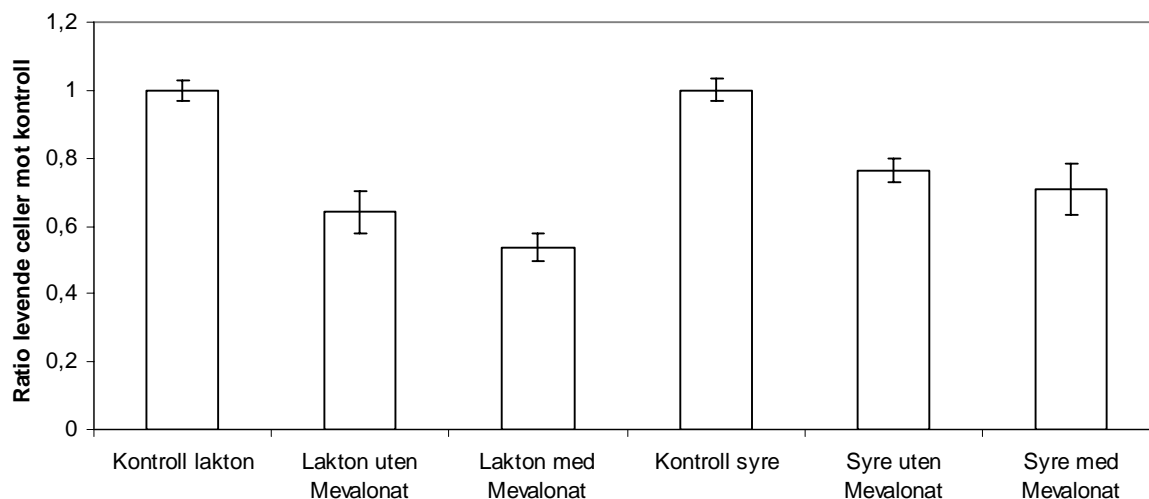
Ved økende grad av statinindusert muskeltoksisitet kan det tenkes at en større og større andel av muskelcellene dør ved nekrose fremfor apoptose. Effekter av mevalonat ved ulike nivåer av statinindusert muskeltoksisitet er derfor undersøkt i denne *in vitro* modellen ($n = 3$). Atorvastatin syre 1200 μM (inkubasjonstid 6 t), atorvastatin lakton 800 og 1200 μM (inkubasjonstid 6 t) samt simvastatin lakton 30 og 100 μM (inkubasjonstid 24 t) gav økende grad av myotoksisitet som ikke lot seg hemme ved tilsetning av mevalonat. Mevalonat hemmer ikke statinindusert muskeltoksisitet verken ved lave- eller høye toksisitetsnivåer (Figur 13).



Figur 13. Atorvastatin syre 1200 μM (inkubasjonstid 6 t), atorvastatin lakton 800 μM (inkubasjonstid 6 t), atorvastatin lakton 1200 μM (inkubasjonstid 6 t), simvastatin lakton 30 μM (inkubasjonstid 24 t) og simvastatin lakton 100 μM (inkubasjonstid 24 t) gav økende grad av myotoksisitet som ikke lot seg hemme ved tilsetning av mevalonat. Gjennomsnitt \pm SD.

8.1.6 Mevalonat tilsatt muskelfibre inkubert med statin på syre- eller laktonform

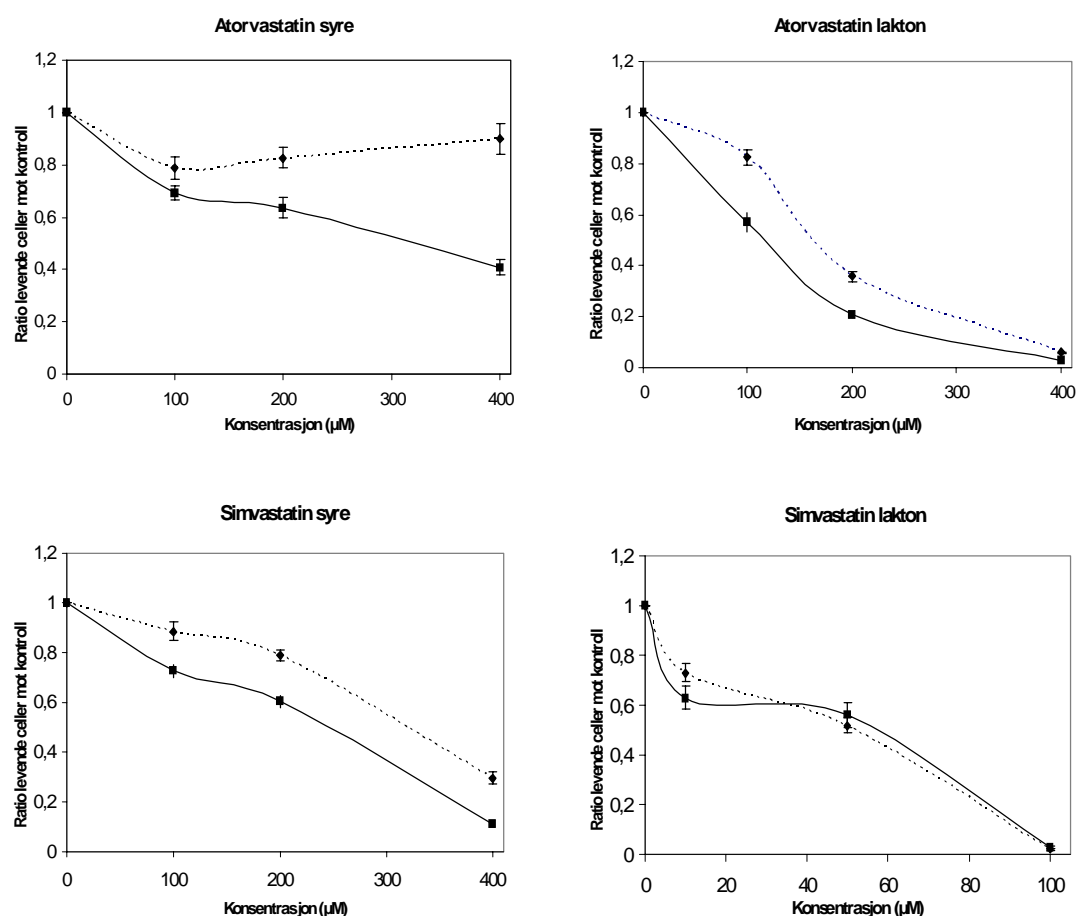
Mevalonat ble tilsatt muskelceller samtidig med atorvastatin lakton 800 μM eller atorvastatin syre 1200 μM og inkubert i 6 timer ($n = 3$). Mevalonat hemmer ikke statinindusert muskeltoksisitet i denne *in vitro* modellen, verken ved syre- eller laktonindusert muskeltoksisitet (Figur 14).



Figur 14. Mevalonat (10 mM) hemmer ikke atorvastatin lakton- (800 μM) eller atorvastatin syre- (1200 μM) induert muskeltoksisitet. Gjennomsnitt \pm SD.

8.2 Muskelceller fra pasienter med statininduserte muskelbivirkninger

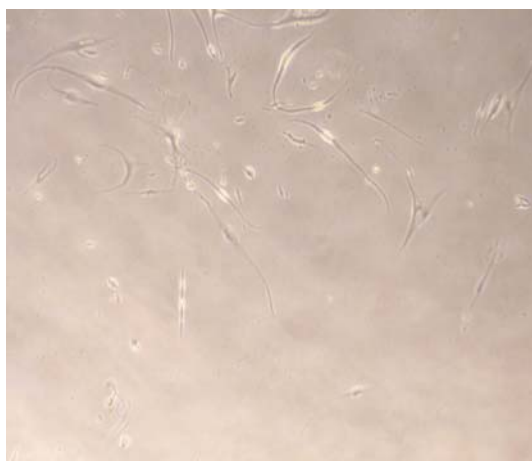
Atorvastatin syre og lakton, samt simvastatin syre ble tilsatt muskelceller i konsentrasjoner på 100, 200 eller 400 μM . Simvastatin lakton ble tilsatt i konsentrasjoner på 10, 50 eller 100 μM . Inkubasjonstiden var 72 timer ($n = 3$, 2 paralleller for hver pasient). Resultatene viser at atorvastatin syre har signifikant større muskeltoksisk potensial på muskelceller isolert fra pasienter med påviste statininduserte muskelbivirkninger sammenliknet med muskelceller isolert fra friske frivillige i denne *in vitro* modellen ($p = 0,000$). Atorvastatin lakton samt simvastatin syre viser også i samme modell kraftigere myotoksisitet på muskelceller isolert fra pasienter med påviste statininduserte muskelbivirkninger sammenliknet med muskelceller isolert fra friske frivillige ($p = 0,016$, $p = 0,004$). Simvastatin lakton har et kraftig muskeltoksisk potensial og ingen forskjell mellom gruppene er vist i denne *in vitro* modellen ($p = 0,844$) (Figur 15).



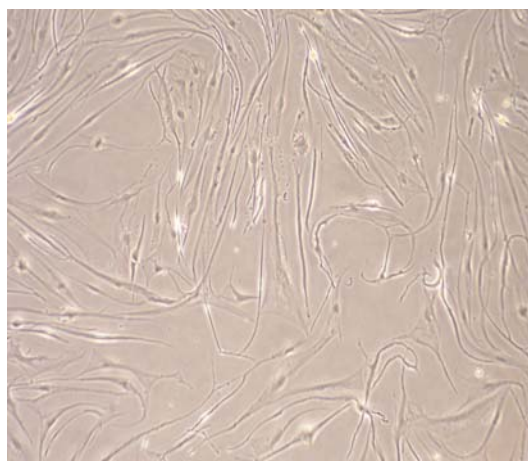
Figur 15. Atorvastatin syre og lakton, samt simvastatin syre er mer myotoksisk på muskelceller isolert fra pasienter med påviste statininduserte muskelbivirkninger (heltrukken linje) sammenliknet med muskelceller isolert fra friske frivillige (striplet linje). Gjennomsnitt $\pm 2 \times \text{SEM}$.

8.3 Endring i morfologi etter statininkubasjon

Atorvastatin og simvastatin på både syre- og laktonform induerte en endring i morfologi, laktonet ved lavere konsentrasjon sammenliknet med korresponderende syreform (Figur 16). Generelt ved høy grad av toksisitet mistet muskelfibrene sin elongerte form og ble mindre og sirkulære. Ved økende grad av toksisitet løsnet cellene fra brønnen, spesielt ved bruk av simvastatin lakton (Figur 17). Koinkubering med mevalonat påvirket ikke disse morfologiske endringene.

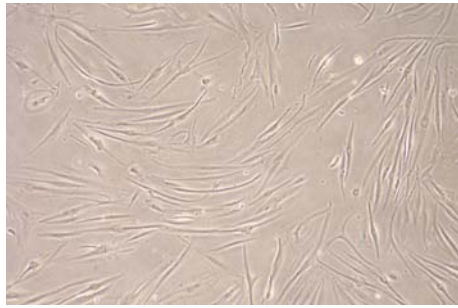


Simvastatin lakton 50 µM

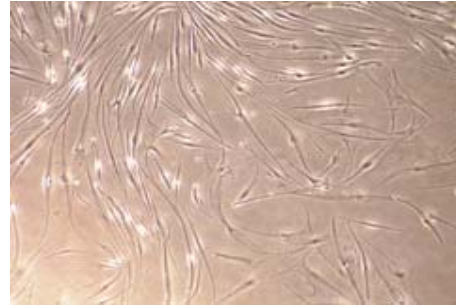


Simvastatin syre 100 µM

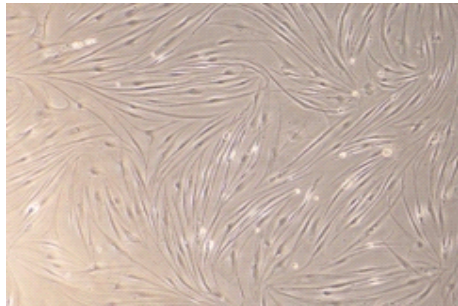
Figur 16. Statin på laktonform induerte morfologiske endringer ved lavere konsentrasjon sammenliknet med tilsvarende syreform.



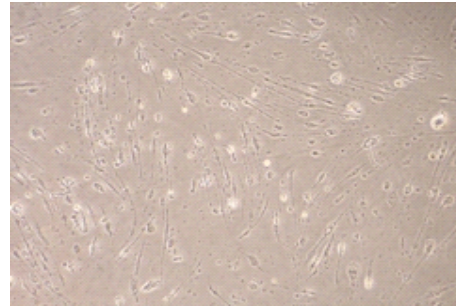
DMSO kontroll



Atorvastatin lakton 100 µM



Atorvastatin lakton 200 µM



Atorvastatin lakton 400 µM



Simvastatin lakton 50 µM



Simvastatin lakton 100 µM

Figur 17. Morfologisk endring av muskelfibre ved økende grad av statinindusert muskeltoksisitet.

9 DISKUSJON

I denne hovedfagsoppgaven er det benyttet en *in vitro* cellemodell. En slik modell er svært nyttig når man ønsker å studere enkeltmekanismer uten påvirkning av mange andre faktorer. *In vitro* har man bedre kontroll på betingelsene og de kan også manipuleres underveis. Det er imidlertid flere begrensninger ved bruk av en *in vitro* modell. For det første bør *in vitro* resultater valideres *in vivo* fordi de fleste funn fra *in vitro* forsøk er utført med isolerte celler som har mistet sin naturlige tilværelse og sine naturlige beskyttelsesmekanismer. *In vitro* forsøk med en enkelt celletype kan også miste relevant toksisitet hvis funksjonen som påvirkes ikke har noen direkte effekt på den involverte celletypen (23).

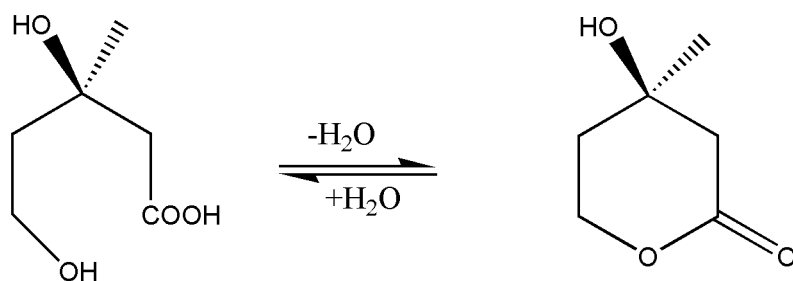
Det kan stilles spørsmål om resultatene fra disse *in vitro* forsøkene kan relateres til en *in vivo* situasjon. Statinkonsentrasjoner i humant vev er foreløpig ikke undersøkt, og det er mulig at lipofile statiner, deriblant atorvastatin og simvastatin akkumulerer i perifere vev (høyt distribusjonsvolum) blant annet skjelettmuskulatur. Når det gjelder rapportering av rabdomyolyse skjer det ofte i forbindelse med en legemiddelinteraksjon som fører til en mangedobling av plasmakonsentrasjonen og muligens også statinkonsentrasjonen i vev. Selv i et slikt tilfelle er imidlertid statinkonsentrasjonene benyttet i denne modellen sannsynligvis noe høye sammenliknet med en *in vivo* situasjon. Høye konsentrasjoner er benyttet fordi inkubasjonstiden er begrenset til 72 timer som er den lengste inkubasjonstiden det er praktisk mulig å benytte i denne modellen. Syre-lakton ratioen for de ulike statinene vil sannsynligvis også være noe forskjellig fordi det fysiologiske miljøet ikke er tilstede *in vitro*. Under fysiologiske forhold vil statiner blant annet kunne undergå enzymatisk konvertering som vil påvirke syre-lakton ratioen.

9.1 Hemming av statinindusert muskeltoksisitet ved tilsetning av mevalonat.

Statiner hemmer omdannelsen av HMG-CoA til mevalonat. Mevalonat er forløper for flere intracellulære komponenter, blant annet terpenier som har flere viktige funksjoner i cellen. Det viste seg at mevalonat ikke hemmet statinindusert muskeltoksisitet *in vitro* ved de ulike betingelsene beskrevet i resultatene. Metodene for utsåing av satellittceller, proliferasjon og differensiering til muskelfibre som ble benyttet er sammenliknbare med tidligere publiserte metoder (24). I denne studien ble det vist at myotoksisiteten forårsaket av simvastatin ble

reduisert ved koadministrasjon med mevalonat. Det er også tidligere vist at myotoksisitet på humane skjelettmuskelceller forårsaket av atorvastatin eller simvastatin kan forhindres ved tilsetning av mevalonat (33). Toksisitet på nerveceller forårsaket av pravastatin er også vist å kunne hemmes ved tilsetning av mevalonat (26). I vår studie ble det benyttet tilsvarende metoder, konsentrasjoner og inkubasjonstider så det ser ikke ut til at metodeforskjeller er årsaken til den manglende effekten av mevalonat i denne *in vitro* modellen. Andre forsøk har imidlertid i likhet med vår studie vist manglende effekt av mevalonat. En studie viste at statinindusert Ca^{2+} økning, som kan være en mulig årsak til statinindusert muskeltoksisitet, ikke lot seg hemme ved tilsetning av mevalonat (27). Det er også vist at statinindusert cytotoxiskitet på myoblaste isolert fra mus ikke kan forhindres ved tilsetning av mevalonat (19).

Mevalonat er tilstede *in vivo* både på syre- og laktonform (Figur 18). I liknende forsøk beskrevet i litteraturen er mevalonat ofte omtalt som "mevalonic acid". Det har ikke vært mulig å få tak i mevalonat på syreform, kun på laktonform, og det er laktonformen som derfor er benyttet i denne *in vitro* modellen. Betegnelsen mevalonat er i denne oppgaven også brukt ved inkubasjon med mevalonolakton.



Figur 18. Mevalonat på syre- og laktonform.

Siden lakton- og syreformen av mevalonat har ulike biokjemiske egenskaper vil dette sannsynligvis påvirke de cellulære effektene. Lakton og syre vil blant annet ha ulik penetrasjon over plasmamembranen ved passiv diffusjon. I dette tilfellet ble det benyttet mevalonolakton som sannsynligvis lettere vil penetrere over plasmamembranen sammenliknet med syreformen. Siden mevalonat sannsynligvis utspiller sin rolle intracellulært, som enten syre eller lakton, kan det derfor tenkes at laktonformen i større grad enn syreformen vil

hemme statinindusert muskeltoksisitet. Det kan imidlertid ikke utelukkes at syreformen tas opp av spesifikke transportører, slik det er beskrevet for statin på syreform (34).

Likevekten mellom syre og lakton er pH avhengig, ved lav pH foreligger mevalonat på laktonform (35). For å teste både syre- og laktonformen av mevalonat ble det utført forsøk både med mevalonat løst i vann (nøytral pH, mesteparten på syreform) og i en sur buffer (pH 3, mesteparten på laktonform). Dette påvirket ikke effekten på cellene og videre undersøkelser gjordes ved nøytral pH da dette er best for cellene.

Mevalonat ble tilsatt muskelcellene før statinet (preinkubasjon), før og samtidig med statinet (koinkubasjon) eller kun samtidig med statinet. Det ble ikke funnet at mevalonat hadde noen hemmende effekter på statintoksisiteten ved noen av inkubasjonsbetingelsene. Ved å tilsette mevalonat før statinet kan det tenkes at cellene øker syntesen av forbindelser som benytter mevalonat som utgangsstoff, hovedsaklig terpenier og kolesterol. Dersom statinindusert muskeltoksisitet skyldes svekket syntese av terpenier grunnet mangel på mevalonat, kan preinkubering med mevalonat tenkes å beskytte cellene mot statinindusert muskeltoksisitet. Dette betinger naturligvis at mevalonat penetrerer plasmamembranen siden terpensyntesen foregår intracellulært. Det har vært forsøkt både 12 og 24 timers preinkubasjon med mevalonat. Ingen av preinkubasjonstidene hemmet statinindusert muskeltoksisitet. Dette kan bety at en økt syntese av terpenier og kolesterol i forkant av statininkubering ikke beskytter cellene mot statinindusert myotoksisitet i tilstrekkelig grad. Det kan også bety at preinkubering bør foregå over betydelig lengre tid med lavere mevalonatkonsentrasjon. Koinkubasjon ble benyttet for å studere cellulær toksisitet ved samtidig nærvær av begge stoffer. Tidligere studier har vist protektiv effekt av mevalonat (24; 26; 33). Verken preinkubasjon eller koinkubasjon førte til hemming av statinindusert muskeltoksisitet i denne *in vitro* modellen.

Økende inkubasjonstid med mevalonat og statin gav, motsatt til hva som teoretisk er sannsynlig, økende myotoksisitet. Mevalonat viste ingen hemmende effekt på statinindusert muskeltoksisitet verken ved kort eller lang inkubasjonstid. Dette betyr at statinets effekt på cellene kommer raskere og er kraftigere enn en eventuell hemmende effekt av mevalonat.

Verken høyere (50 mM) eller lavere (1 mM) mevalonatkonsentrasjoner har ført til hemming av statinindusert muskeltoksisitet. Resultatene indikerer at mevalonat ved økende konsentrasjon har en toksisk effekt på cellene, hvilket er i samsvar med tidligere funn (24). Dette viser at mevalonat har andre effekter på muskelcellene i denne *in vitro* modellen, effekter som ikke nødvendigvis betinger at mevalonat opptas intracellulært fra vekstmediet.

Ved økende konsentrasjon av et potensielt toksisk stoff vil flere og flere celler dø av nekrose fremfor apoptose (23), hvilket også muligens skjer i denne modellen ved inkubasjon med økende statinkonsentrasjoner. Mekanismen bak myotoksisiteten er foreløpig ikke kjent, og det er ikke undersøkt om cellene dør av apoptose eller nekrose i denne *in vitro* modellen. Det er mulig at mevalonat kun er i stand til å hemme statinindusert apoptose, ikke nekrose som det ser ut til at kan skje ved høye statinkonsentrasjoner. Selv ved de laveste statinkonsentrasjonene var det imidlertid ingen hemmende effekt av mevalonat, så mevalonat hemmer sannsynligvis verken statinindusert apoptose eller nekrose i denne *in vitro* modellen.

Det er tidligere vist at statin på laktonform er mer myotoksisk sammenliknet med tilsvarende syreform, og at simvastatin er mer myotoksisk enn atorvastatin (14), muligens på grunn av ulike toksisitetsprosesser. Mevalonat hemmet verken simvastatin- eller atorvastatinindusert muskeltoksisitet i denne *in vitro* modellen. Det var heller ingen forskjell på om toksisiteten var forårsaket av syre eller lakton.

Det er ikke målt intracellulære konsentrasjoner av mevalonat i denne modellen, og det er derfor usikkert om mevalonat virkelig penetrerer plasmamembranen. Tidligere forsøk med andre terpenener som FPP og GGPP viste at de penetrerte plasmamembranen svært dårlig. Liposomer ble i dette tilfellet benyttet for å frakte disse terpenene over plasmamembranen (26).

Dersom mevalonat er tilstede intracellulært i tilstrekkelig konsentrasjon og på riktig tidspunkt betyr det at statinindusert muskeltoksisitet i denne *in vitro* modellen ikke er mevalonatavhengig, men heller er forårsaket av andre effekter.

9.2 Muskelceller fra pasienter med statininduserte muskelbivirkninger

Muskelceller fra pasienter med påviste statininduserte muskelbivirkninger var signifikant mer følsomme for statiner sammenliknet med muskelceller fra friske frivillige personer. Dette kan skyldes en endret fenotype som gjør cellene fra pasientene mer følsomme for statinindusert muskeltoksisitet. En eventuell alternativ fenotype hos pasientene skyldes da sannsynligvis en eller flere spesifikke genotyper siden muskelfibrene *in vitro* prolifiseres fra satellittcellene og ikke kommer direkte fra pasientene. Det er identifisert flere gener som gir ulike metabolske myopatiser og som også spiller en rolle i utviklingen av statininduserte muskelbivirkninger (29). Det er ikke testet for disse genene i denne studien.

Ved kraftig toksisitet, som sees ved inkubering med simvastatin lakton, vistes ingen forskjell i myotoksisitet mellom de to gruppene. En mulig forklaring kan være at denne toksisiteten er forårsaket av nekrose i stedet for apoptose. Ved kraftig og plutselig toksisitet, som skjer ved tilsetning av simvastatin lakton, vil sannsynligvis cellen svulle for deretter å sprekke (nekrose). Dette er en prosess som skjer uten at det indre cellemaskineriet aktiveres og fenotypen har således mindre å si. Apoptose er en mer forsiktig, langsom prosess som aktivt styres av ulike intracellulære komponenter. I et slikt tilfelle vil sannsynligvis fenotypen ha mer å si. En endret fenotype hos pasientene vil derfor sannsynligvis ikke komme til syne i dette tilfellet av nekrose men muligens kun ha en innvirkning på apoptose.

Det er benyttet celler fra fire friske frivillige og celler fra fire pasienter med påviste statininduserte muskelbivirkninger. De friske frivillige er ikke eksponert for statiner *in vivo* og det er derfor uvisst hvorvidt disse personene ville ha utviklet muskelsymptomer ved en eventuell behandling med statiner.

Det ser derfor ut til at genotypen har en viss effekt på utviklingen av statininduserte muskelbivirkninger. Det burde da være mulig å teste for risikopasienter før initiering av statinterapi, bare de relevante genene kan identifiseres.

10 KONKLUSJON

10.1 Hemming av statinindusert muskeltoksisitet ved tilsetning av mevalonat

Det ble forsøkt ulike forsøksbetingelser for å optimalisere metoden med tanke på å avdekke en eventuell protektiv effekt av mevalonat *in vitro*. Mevalonat hemmer ikke statinindusert muskeltoksisitet i denne *in vitro* modellen verken ved preinkubering, økende inkubasjonstid eller økende konsentrasjon. Dette betyr at mevalonat enten ikke penetrerer plasmamembranen ved bruk av den beskrevne metode eller at den observerte statininduserte muskeltoksitet skyldes en mevalonatuavhengig prosess.

10.2 Muskelceller fra pasienter med statininduserte muskelbivirkninger

Muskelceller fra pasienter med påviste statininduserte muskelbivirkninger er signifikant mer følsomme for statiner *in vitro* sammenliknet med muskelceller fra friske frivillige. Ved kraftig myotoksisitet påvistes ingen forskjell, en mulig forklaring kan være at det er en nekrotisk prosess.

10.3 Hva kan gjøres videre?

Det er ikke målt intracellulære konsentrasjoner av mevalonat i denne *in vitro* modellen og det er derfor usikkert om mevalonat penetrerer plasmamembranen og således er tilstede intracellulært. En metode for intracellulær konsentrasjonsmåling av mevalonat før og etter tilsetning av mevalonat til cellene hadde vært nyttig for å kunne tolke resultatene fra denne *in vitro* modellen bedre.

For å forlenge mevalonatpåvirkningen på cellene kunne mevalonat vært tilsatt i mediet gjennom hele proliferasjons- og differensieringsprosessen. Cellene ville da over lengre tid kunne øke syntesen av terpenet og kolesterol hvilket kunne gjøre de mer resistente mot statinindusert muskeltoksisitet, så sant denne toksisiteten skyldes en forstyrrelse i terpensyntesen og at mevalonat penetrerer plasmamembranen ved bruk av denne *in vitro* metoden.

Det er identifisert bestemte gener som kan gi opphav til ulike metabolske myopatier og således spille en rolle i utviklingen av statininduserte muskelbivirkninger. Data viser at 10 % av pasienter på lipidsenkende behandling har en eller flere av disse mutasjonene. Pasienter med påviste statininduserte muskelbivirkninger kan genotypes for mutasjoner i disse spesifikke genene som kan føre til økt risiko for statininduserte muskelbivirkninger. Det kan også søkes etter nye genotyper som kan spille en rolle ved utvikling av statinrelaterte muskelsymptomer.

11 REFERANSELISTE

- 1 Herfindal, Eric T, Gourley, Dick. R (2000). *Textbook of therapeutics: drug and disease management*.
- 2 Vilberg, Astri (2004). *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell*. Oslo.
- 3 Unknown (2003). "Behandling med lipidsenkende legemidler for å forebygge hjerte- og karsykdom." *Nytt om legemidler* 5: 10-17.
- 4 Apotekforeningen (2007). *Apotek og legemidler*. Oslo.
- 5 Laaksonen, R. (2006). "On the mechanisms of statin-induced myopathy." *Clin Pharmacol Ther* 79(6): 529-31.
- 6 Evans, M. and A. Rees (2002). "Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscle: are all statins the same?" *Drug Saf* 25(9): 649-63.
- 7 Samuelsson, Gunnar (2004). *Drugs of natural origin*. Stockholm.
- 8 Rang, Dale, Ritter, Moore (2003). *Pharmacology*.
- 9 Sakaeda, T., et al. (2006). "Effects of acid and lactone forms of eight HMG-CoA reductase inhibitors on CYP-mediated metabolism and MDR1-mediated transport." *Pharm Res* 23(3): 506-12.
- 10 Grabarkiewicz, T., et al. (2006). "DFT study on hydroxy acid-lactone interconversion of statins: The case of fluvastatin." *Org Biomol Chem* 4(23): 4299-306.
- 11 Lilja, Kivisto, Neuvonen (1999). "Grapefruit juice increases serum concentrations of atorvastatin and has no effect on pravastatin." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 66: 118-127.
- 12 Molden, E. and A. Asberg (2001). "[Metabolic interactions with statins]." *Tidsskr Nor Lægeforen* 121(2): 189-93.
- 13 Christopher-Stine, L. (2006). "Statin myopathy: an update." *Curr Opin Rheumatol* 18(6): 647-53.
- 14 Skottheim, Ine Blankenberg, Gedde-Dahl, Ane and Åsberg, Anders. (2007). "Statin induced myotoxicity: the lactone forms are more potent than the acid forms in human skeletal muscle cells in vitro."
- 15 Guis, S., et al. (2003). "Drug-induced and toxic myopathies." *Best Pract Res Clin Rheumatol* 17(6): 877-907.
- 16 Ronaldson, K. J., et al. (2006). "Risk factors for rhabdomyolysis with simvastatin and atorvastatin." *Drug Saf* 29(11): 1061-7.

- 17 Bruckert , Hayem , Dejager , Yau , Begaud (2006). "Mild to Moderate Muscular Symptoms with High-Dosage Statin Therapy in Hyperlipidemic Patients - The PRIMO Study." *Cardiovascular Drugs and Therapy* 19: 403-414.
- 18 Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter (2002). *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Science.
- 19 Kaufmann, P (2006). "Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria." *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 2415-2425.
- 20 Pasternak, R. C., et al. (2002). "ACC/AHA/NHLBI Clinical Advisory on the Use and Safety of Statins." *Stroke* 33(9): 2337-41.
- 21 Schreiber, D. H. and T. R. Anderson (2006). "Statin-induced rhabdomyolysis." *J Emerg Med* 31(2): 177-80.
- 22 Baker, S. K. (2005). "Molecular clues into the pathogenesis of statin-mediated muscle toxicity." *Muscle Nerve* 31(5): 572-80.
- 23 Gerard J Mulder, Lennart Dencker (2006). *Pharmaceutical Toxicology*. London, Pharmaceutical Press.
- 24 Sacher, J., et al. (2005). "Delineation of myotoxicity induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors in human skeletal muscle cells." *J Pharmacol Exp Ther* 314(3): 1032-41.
- 25 Johnson, T. E., et al. (2004). "Statins induce apoptosis in rat and human myotube cultures by inhibiting protein geranylgeranylation but not ubiquinone." *Toxicol Appl Pharmacol* 200(3): 237-50.
- 26 Tanaka, T., et al. (2000). "Geranylgeranyl-pyrophosphate, an isoprenoid of mevalonate cascade, is a critical compound for rat primary cultured cortical neurons to protect the cell death induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibition." *J Neurosci* 20(8): 2852-9.
- 27 Sirvent, P., et al. (2005). "Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca²⁺ signaling alteration in skeletal muscle." *Biochem Biophys Res Commun* 329(3): 1067-75.
- 28 Guis, S., et al. (2006). "In vivo and in vitro characterization of skeletal muscle metabolism in patients with statin-induced adverse effects." *Arthritis Rheum* 55(4): 551-7.
- 29 Vladutiu, G. D., et al. (2006). "Genetic risk factors associated with lipid-lowering drug-induced myopathies." *Muscle Nerve* 34(2): 153-62.
- 30 Anderson, Douglas M. (2003). *Dorland's illustrated medical dictionary*. Philadelphia.
- 31 Fiegenbaum, M., et al. (2005). "The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment." *Clin Pharmacol Ther* 78(5): 551-8.
- 32 Thompson, P. D., et al. (2003). "Statin-associated myopathy." *Jama* 289(13): 1681-90.

- 33** Nishimoto, T., et al. (2003). "Comparing myotoxic effects of squalene synthase inhibitor, T-91485, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors in human myocytes." *Biochem Pharmacol* 66(11): 2133-9.
- 34** Hsiang B, Zhu Y, Wang Z (1999). "A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP 2)." *Journal of Biological Chemistry* 274: 37161-37168.
- 35** Woollen, Holme, Northway, Martin (2001). "Determination of mevalonic acid lactone by gas chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography B* 760: 179-184.

12 APPENDIKS

12.1 Kjemikalieliste

<i>Kjemikalium</i>	<i>Produsent</i>
Atorvastatin lakton	Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada
Atorvastatin syre	Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenfosfat	VWR Prolabo, Fontenay sous Bois, Frankrike
DMEM	Gibco, Paisley, UK
ECM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fluorescein diacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fungizone	Gibco, Paisley, UK
Føtalt kalveserum	Gibco, Paisley, UK
Insulin Actrapid [®]	NovoNordisk, Bagsværd, Danmark
Kaliumdihydrogenfosfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kaliumklorid	Merck, Darmstadt, Tyskland
Mevalonolakton	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumklorid	Merck, Darmstadt, Tyskland
Penicillin	Gibco, Paisley, UK
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Simvastatin, lakton	Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada
Simvastatin, syre	Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada
Streptomycin	Gibco, Paisley, UK
Ultroser G [®]	Ciphergen BioSystems, Paris, Frankrike

12.2 Utstysrliste

<i>Utstyr</i>	<i>Leverandør</i>
Digitalkamera: Olympus Camedia C-7070	Olympus, Oslo, Norge
Fasekontrast mikroskop: Olympus CKX41	Olympus, Oslo, Norge
Fluorescensmikroskop: Eclipse TE 300 DV (med kamera fra RT diagnostic instruments)	Nikon, Washington DC, USA
Inkubator: Nuaire US Autoflow	NuAire, Plymouth, USA
LAF benk: Holten LaminAir	Medinor, Oslo, Norge
Mikroplateleser: Wallac 1420 Victor 3 TM	PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc, Quebec, Canada
Minishaker: MS2	IKA [®] , Los Angeles, USA
Nitrogentank: Locator 8 plus	Barnstead International, Iowa, USA
pH-meter:	Beckman, Oslo, Norge
Sentrifuge: Kubota 2010	Medinor, Oslo, Norge
Vannbad: termostat HWT 100	Heto Holten, Oslo, Norge
Vekt: AB54	Mettler Toledo, Oslo, Norge

Det øvrige utstyret som ble benyttet var standard laboratorieutstyr.

12.3 Løsninger

ECM-blanding

5 ml ECM gel

70 ml DMEM m/Glutamax-1

(fortynnes 1:5 ved bruk)

Utsåingsmedium

500 ml DMEM m/Glutamax-1

50 ml FCS

2,5 ml Penicillin-Streptomycin 10.000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone

Proliferasjonsmedium

500 ml DMEM m/Glutamax-1

10 ml FCS

10 ml Ultroser G

2,5 ml Penicillin-Streptomycin 10.000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone

Differensieringsmedium

500 ml DMEM m/Glutamax-1

10 ml FCS

2,5 ml Penicillin-Streptomycin 10.000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone

25 pmol insulin (21 µl av 1000 ganger fortynning av insulin Actrapid® Penfill 0,6 mM)

PBS (pH 7,2-7,4)

1,0 liter destillert vann

8,0 g NaCl

2,9 g Na₂HPO₄

0,2 g KH₂PO₄

0,2 g KCl

PI/FdA løsning

40 ml PBS

40 µl PI

4, 0 µl FdA

Natrium-formiat buffer

3,77 ml maursyre

100 ml destillert vann

NaOH til pH 3,0

12.4 Behandling av rådata

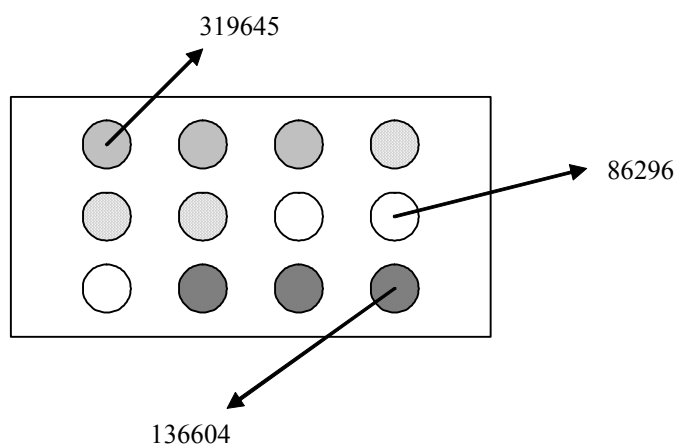
<u>FdA, celler fra skript plate</u>			<u>PI, celler fra skript plate</u>		
Plate I	871594	16,76	Plate I	3826	16,66
	878581	18,09		4114	17,99
	939222	19,41		4643	19,31
	814323	20,74		4056	20,63
	1,04E+06	22,06		5843	21,96
	874292	23,39		4242	23,28
	544274	24,71		3170	24,61
	538311	26,04		3366	25,93
	625991	27,36		3562	27,26
	579994	28,69		4176	28,58
	605474	30,01		3357	29,91
	428342	31,34		2945	31,23
Plate II	319645	35,12	Plate II	2900	35,01
	355996	36,44		2748	36,33
	299916	37,76		2407	37,65
	263678	39,09		2572	38,98
	267451	40,41		2530	40,3
	304583	41,74		2987	41,63
	114951	43,06		2373	42,95
	86296	44,39		1832	44,28
	112311	45,71		1935	45,6
	144656	47,04		2298	46,93
	223942	48,36		2509	48,25
	136604	49,69		2232	49,58
Plate III	36921	53,46	Plate III	1920	53,35
	36084	54,78		1956	54,68
	37747	56,11		1917	56
	15717	57,43		1734	57,33
	14596	58,76		1922	58,65
	12219	60,08		1618	59,98
	488192	61,41		3643	61,3
	422275	62,73		3198	62,63
	443676	64,06		3185	63,95
	338114	65,38		2723	65,28
	279093	66,71		2644	66,6
	272603	68,03		3033	67,93
Plate IV	37671	71,81	Plate IV	2104	71,7
	23787	73,14		1930	73,02
	27056	74,46		2332	74,35
	220826	75,79		2182	75,67
	408158	77,11		2988	77
	402504	78,44		2896	78,32
	356973	79,76		3239	79,65
	316198	81,09		3058	80,97
	249948	82,41		2290	82,29
	24452	83,74		1870	83,62
	11875	85,06		1110	84,94
	12172	86,39		1378	86,27

Eksempel på tallmateriale (rådata) etter fluorescensmåling på plateleser Wallac 1420 Victor 3TM.

FdA, celler fra skrappt plate

871594	814323	544274	579994	319645	263678	114951
878581	1,04E+06	538311	605474	355996	267451	86296
939222	874292	625991	428342	299916	304583	112311
144656	36921	15717	488192	338114	37671	220826
223942	36084	14596	422275	279093	23787	408158
136604	37747	12219	443676	272603	27056	402504
356973	24452					
316198	11875					
249948	12172					

Dataene ble sortert i grupper på tre ved hjelp av macro-funksjonen i Excel[®]. Hvert tall refererer til en brønn på platen (Figur 19). Det ble benyttet 12 brønners plater så de fire første kolonnene tilsvarer en plate o.s.v.



Figur 19. En 12-brønns plate med 4 ulike behandlinger (AS 100 µM, AS 200 µM, AS 400 µM, AL 100 µM) der n=3.

Behandling	Blank	DMSO	AS 100	AS 200	AS 400	AL 100	AL 200
(forsøk 32)	871594	544274	319645	263678	114951	144656	36921
AMD 6	878581	538311	355996	267451	86296	223942	36084
	939222	625991	299916	304583	112311	136604	37747
	814323	579994					
	1,04E+06	605474					
	874292	428342					
Average		553731					
Ratio	1,574038658	0,98292131	0,577256827	0,476184284	0,207593579	0,26123876	0,06667678
	1,586656698	0,972152543	0,642904226	0,482998062	0,155844625	0,404423809	0,065165216
	1,696170162	1,130496577	0,541627613	0,550055894	0,202825921	0,246697404	0,068168479
	1,470611181	1,047429167					
	1,877463967	1,09344429					
	1,57891106	0,773556113					
Average	1,630641954	1	0,587262889	0,503079413	0,188754708	0,304119991	0,066670158
SD	0,14045613	0,126771222	0,0513744	0,040825227	0,028600486	0,087169402	0,001501643

Behandling	AL 400	SS 100	SS 200	SS 400	SL 10	SL 50	SL 100
(forsøk 32)	15717	488192	338114	37671	220826	356973	24452
AMD 6	14596	422275	279093	23787	408158	316198	11875
	12219	443676	272603	27056	402504	249948	12172
Ratio	0,028383818	0,881641086	0,610610567	0,068031228	0,398796528	0,644668621	0,044158626
	0,026359369	0,762599529	0,504022711	0,042957682	0,737105201	0,571031783	0,021445431
	0,022066671	0,80124826	0,492302219	0,04886127	0,726894467	0,451388851	0,021981793
Average	0,025603286	0,815162958	0,535645166	0,053283393	0,620932065	0,555696418	0,029195283
SD	0,00322573	0,060728388	0,065185896	0,013108664	0,192442751	0,09754818	0,01296141

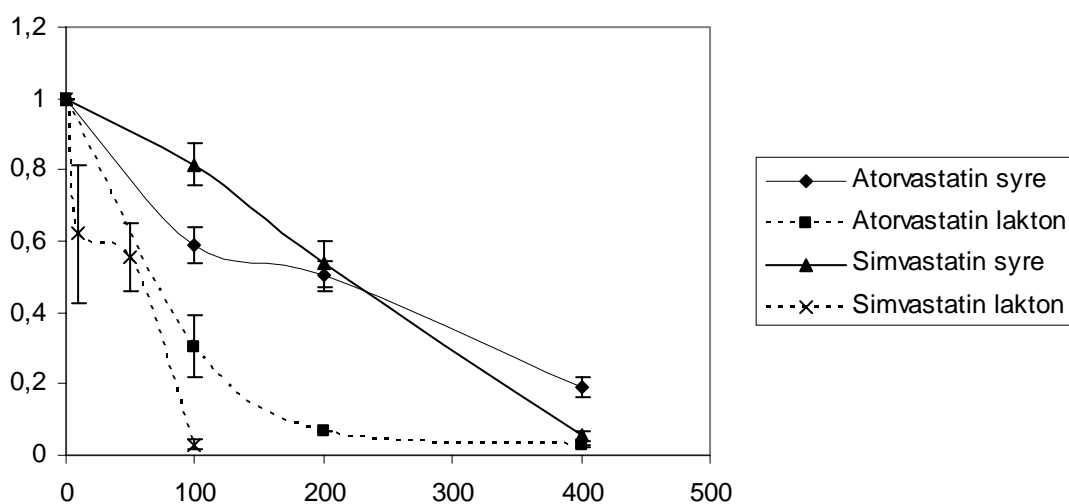
De ulike behandlingene ble skrevet inn over sine respektive data. For kontrollene blank og DMSO var n=6, for de andre behandlingene var n=3. Gjennomsnitt av DMSO-kontrollen ble regnet ut. Ratioen levende celler mot kontroll ble regnet ut ved å dele dataene fra de ulike behandlingene på gjennomsnittet av DMSO-kontrollen. Deretter ble det igjen regnet ut gjennomsnittet av disse ratioene. Disse tallene ble brukt videre for å fremstille resultatet grafisk. SD og 2×SEM ble også regnet ut.

Average	0	10	50	100	200	400
DMSO						
Atorvastatin syre	1		0,587262889	0,503079413	0,188754708	
Atorvastatin lakton	1		0,304119991	0,066670158	0,025603286	
Simvastatin syre	1		0,815162958	0,535645166	0,053283393	
Simvastatin lakton	1	0,620932065	0,555696418	0,029195283		

SD	0	10	50	100	200	400
DMSO						
Atorvastatin syre	0		0,0513744	0,040825227	0,028600486	
Atorvastatin lakton	0		0,087169402	0,001501643	0,00322573	
Simvastatin syre	0		0,060728388	0,065185896	0,013108664	
Simvastatin lakton	0	0,192442751	0,09754818	0,01296141		

De samme ratio-dataene ble systematisert før den grafiske fremstillingen.

Forsøk 32 (AMD 6)



Excel[®] ble benyttet til den grafiske fremstillingen av ratioene og standardavviket (SD).

12.5 Hemming av statinindusert muskeltoksisitet ved tilsetning av mevalonat (rådata)

Behandling (inkubasjonstid statin 12 t, 10 mM mevalonat, n = 3)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll	1,316
DMSO kontroll	1,000
Mevalonat kontroll	0,936
DMSO Mevalonat kontroll	0,881
SL 30 µM	0,546
SL 30 µM + Mevalonat preink (12 t) + Mevalonat koink	0,305
SL 30 µM + Mevalonat preink (24 t) + Mevalonat koink	0,255
SL 30 µM + Mevalonat preink (12 t)	0,072
SL 30 µM + Mevalonat preink (24 t)	0,030
SL 100 µM	0,011
SL 100 µM + Mevalonat preink (12 t) + Mevalonat koink	0,009
SL 100 µM + Mevalonat preink (24 t) + Mevalonat koink	0,009
SL 100 µM + Mevalonat preink (12 t)	0,022
SL 100 µM + Mevalonat preink (24 t)	0,010
SL 30 µM + Mevalonat koink	0,328
SL 100 µM + Mevalonat koink	0,006
DMSO Mevalonat/buffer kontroll	0,574
SL 100 µM + Mevalonat/buffer preink (12 t) + Mevalonat/buffer koink	0,008
SL 100 µM + Mevalonat/buffer preink (24 t) + Mevalonat/buffer koink	0,009
SL 100 µM + Mevalonat/buffer preink (12 t)	0,011
SL 100 µM + Mevalonat/buffer preink (24 t)	0,010
SL 100 µM + Mevalonat/buffer koink	0,010

Behandling (inkubasjonstid statin 24 t, 10 mM mevalonat, n = 3)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll	1,237
DMSO kontroll	1,000
Mevalonat kontroll	0,580
DMSO Mevalonat kontroll	0,547
SL 30 µM	0,377
SL 30 µM + Mevalonat preink (12 t) + Mevalonat koink	0,024
SL 30 µM + Mevalonat preink (24 t) + Mevalonat koink	0,063
SL 30 µM + Mevalonat preink (12 t)	0,261
SL 30 µM + Mevalonat preink (24 t)	0,291
SL 100 µM	0,014

SL 100 µM + Mevalonat preink (12 t) + Mevalonat koink	0,007
SL 100 µM + Mevalonat preink (24 t) + Mevalonat koink	0,007
SL 100 µM + Mevalonat preink (12 t)	0,015
SL 100 µM + Mevalonat preink (24 t)	0,009
SL 30 µM + Mevalonat koink	0,792
SL 100 µM + Mevalonat koink	0,015
DMSO Mevalonat/buffer kontroll	0,713
SL 100 µM + Mevalonat/buffer preink (12 t) + Mevalonat/buffer koink	0,019
SL 100 µM + Mevalonat/buffer preink (24 t) + Mevalonat/buffer koink	0,007
SL 100 µM + Mevalonat/buffer preink (12 t)	0,006
SL 100 µM + Mevalonat/buffer preink (24 t)	0,009
SL 100 µM + Mevalonat/buffer koink	0,011

Behandling (inkubasjonstid statin 12 t, 10 mM mevalonat, n = 3)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll	1,058
Mevalonat (nylaget) kontroll	1,358
Mevalonat/buffer kontroll	1,797
DMSO kontroll	1,000
DMSO Mevalonat (nylaget) kontroll	0,996
DMSO Mevalonat/buffer kontroll	1,035
SL 30 µM	1,010
SL 30 µM + Mevalonat/buffer	0,582
SL 30 µM + Mevalonat (nylaget)	0,690
SL 100 µM	0,020
SL 100 µM + Mevalonat/buffer	0,018
SL 100 µM + Mevalonat (nylaget)	0,009

Behandling (inkubasjonstid statin 3 eller 6 t, 10 mM mevalonat, n = 3)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll (6 t)	3,176
DMSO kontroll (6 t)	1,000
SL 50 µM (6 t)	0,028
SL 100 µM (6 t)	0,031
SL 50 µM (6 t) + Mevalonat	0,026
SL 100 µM (6 t) + Mevalonat	0,027
Kontroll (3 t)	1,153
DMSO kontroll (3 t)	1,000
SL 50 µM (3 t)	0,030

SL 100 μ M (3 t)	0,021
SL 50 μ M (3 t) + Mevalonat	0,036
SL 100 μ M (3 t) + Mevalonat	0,020

Behandling (inkubasjonstid statin 1, 3 eller 6 t, 10 mM mevalonat, n = 3)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll (1 t)	1,000
Mevalonat kontroll (1 t)	0,914
DMSO kontroll (1 t)	1,000
DMSO Mevalonat kontroll (1 t)	0,887
AL 400 μ M (1 t)	0,903
AL 800 μ M (1 t)	0,923
AL 400 μ M (1 t) + Mevalonat	0,879
AL 800 μ M (1 t) + Mevalonat	0,771
Kontroll (3 t)	1,028
Mevalonat kontroll (3 t)	0,980
DMSO kontroll (3 t)	1,000
DMSO Mevalonat kontroll (3 t)	0,863
AL 400 μ M (3 t)	0,694
AL 800 μ M (3 t)	0,698
AL 400 μ M (3 t) + Mevalonat	0,652
AL 800 μ M (3 t) + Mevalonat	0,718
Kontroll (6 t)	1,023
Mevalonat kontroll (6 t)	0,949
DMSO kontroll (6 t)	1,000
DMSO Mevalonat kontroll (6 t)	0,884
AL 400 μ M (6 t)	0,674
AL 800 μ M (6 t)	0,640
AL 400 μ M (6 t) + Mevalonat	0,660
AL 800 μ M (6 t) + Mevalonat	0,536

Behandling (inkubasjonstid statin 1, 3 eller 6 t, 1 mM mevalonat, n = 3)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll (1 t)	1,053
Mevalonat kontroll (1 t)	0,912
DMSO kontroll (1 t)	1,000
DMSO Mevalonat kontroll (1 t)	0,874
AL 800 μ M (1 t)	1,021
AL 1200 μ M (1 t)	1,017

AL 800 µM (1 t) + Mevalonat	0,900
AL 1200 µM (1 t) + Mevalonat	0,983
Kontroll (3 t)	0,909
Mevalonat kontroll (3 t)	0,922
DMSO kontroll (3 t)	1,000
DMSO Mevalonat kontroll (3 t)	0,848
AL 800 µM (3 t)	0,785
AL 1200 µM (3 t)	0,827
AL 800 µM (3 t) + Mevalonat	0,812
AL 1200 µM (3 t) + Mevalonat	0,733
Kontroll (6 t)	1,105
Mevalonat kontroll (6 t)	1,066
DMSO kontroll (6 t)	1,000
DMSO Mevalonat kontroll (6 t)	0,989
AL 800 µM (6 t)	0,624
AL 1200 µM (6 t)	0,543
AL 800 µM (6 t) + Mevalonat	0,608
AL 1200 µM (6 t) + Mevalonat	0,522

Behandling (inkubasjonstid statin 3 eller 6 t, 10 eller 50 mM mevalonat, n = 3)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll (3 t)	1,336
Mevalonat (10 mM) kontroll (3 t)	1,235
Mevalonat (50 mM) kontroll (3 t)	1,122
DMSO kontroll (3 t)	1,000
DMSO Mevalonat (10 mM) kontroll (3 t)	1,092
DMSO Mevalonat (50 mM) kontroll (3 t)	1,079
AL 800 µM (3 t)	1,143
AL 800 µM (3 t) + Mevalonat (10 mM)	1,089
AL 800 µM (3 t) + Mevalonat (50 mM)	1,022
AL 400 µM (3 t)	1,219
AL 400 µM (3 t) + Mevalonat (10 mM)	1,284
AL 400 µM (3 t) + Mevalonat (50 mM)	1,092
Kontroll (6 t)	0,990
Mevalonat (10 mM) kontroll (6 t)	1,068
Mevalonat (50 mM) kontroll (6 t)	0,771
DMSO kontroll (6 t)	1,000
DMSO Mevalonat (10 mM) kontroll (6 t)	1,005
DMSO Mevalonat (50 mM) kontroll (6 t)	0,759
AL 800 µM (6 t)	0,795

AL 800 μ M (6 t) + Mevalonat (10 mM)	0,631
AL 800 μ M (6 t) + Mevalonat (50 mM)	0,286
AL 400 μ M (6 t)	0,794
AL 400 μ M (6 t) + Mevalonat (10 mM)	0,742
AL 400 μ M (6 t) + Mevalonat (50 mM)	0,458

Behandling (inkubasjonstid statin 3 eller 6 t, 10 mM mevalonat, n = 3)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll (3 t)	1,008
Mevalonat kontroll (3 t)	0,979
DMSO kontroll (3 t)	1,000
DMSO Mevalonat kontroll (3 t)	0,772
AL 400 μ M (3 t)	0,359
AL 400 μ M (3 t) + Mevalonat	0,624
AL 800 μ M (3 t)	0,933
AL 800 μ M (3 t) + Mevalonat	0,944
AS 1200 μ M (3 t)	0,697
AS 1200 μ M (3 t) + Mevalonat	0,732
AS 2400 μ M (3 t)	0,644
AS 2400 μ M (3 t) + Mevalonat	0,696
Kontroll (6 t)	1,081
Mevalonat kontroll (6 t)	1,078
DMSO kontroll (6 t)	1,000
DMSO Mevalonat kontroll (6 t)	0,919
AL 400 μ M (6 t)	0,853
AL 400 μ M (6 t) + Mevalonat	0,753
AL 800 μ M (6 t)	0,693
AL 800 μ M (6 t) + Mevalonat	0,703
AS 1200 μ M (6 t)	0,761
AS 1200 μ M (6 t) + Mevalonat	0,735
AS 2400 μ M (6 t)	0,747
AS 2400 μ M (6 t) + Mevalonat	0,618

Behandling (inkubasjonstid statin 3 t, 10 mM mevalonat, n = 6)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll	1,085
DMSO kontroll	1,000
AL 400 μ M	1,056
AL 400 μ M + Mevalonat	1,000

AL 800 μ M	1,096
AL 800 μ M + Mevalonat	1,089
AS 1200 μ M	1,134
AS 1200 μ M + Mevalonat	1,144
AS 2400 μ M	1,191
AS 2400 μ M + Mevalonat	1,061

Behandling (inkubasjonstid statin 3 t, 10 mM mevalonat, n = 6)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll	1,309
DMSO kontroll	1,000
AL 400 μ M	1,199
AL 400 μ M + Mevalonat	1,049
AL 800 μ M	1,120
AL 800 μ M + Mevalonat	0,845
AS 1200 μ M	1,560
AS 1200 μ M + Mevalonat	1,409
AS 2400 μ M	1,343
AS 2400 μ M + Mevalonat	1,101

Behandling (inkubasjonstid statin 6 t, 10 mM mevalonat, n = 6)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll (6 t)	0,941
Mevalonat kontroll (6 t)	0,962
DMSO kontroll (6 t)	1,000
DMSO Mevalonat kontroll (6 t)	0,771
AL 400 μ M (6 t)	0,875
AL 400 μ M (6 t) + Mevalonat	0,877
AL 800 μ M (6 t)	1,013
AL 800 μ M (6 t) + Mevalonat	0,965
AS 1200 μ M (6 t)	0,786
AS 1200 μ M (6 t) + Mevalonat	0,740
AS 2400 μ M (6 t)	0,757
AS 2400 μ M (6 t) + Mevalonat	0,638

Behandling (inkubasjonstid statin 6 t, 10 mM mevalonat, n = 6)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll (6 t)	1,097
Mevalonat kontroll (6 t)	1,019
DMSO kontroll (6 t)	1,000
DMSO Mevalonat kontroll (6 t)	0,827
AL 400 μ M (6 t)	1,098
AL 400 μ M (6 t) + Mevalonat	1,108
AL 800 μ M (6 t)	1,201
AL 800 μ M (6 t) + Mevalonat	1,141
AS 1200 μ M (6 t)	0,971
AS 1200 μ M (6 t) + Mevalonat	0,911
AS 2400 μ M (6 t)	1,068
AS 2400 μ M (6 t) + Mevalonat	0,959

12.6 Muskelceller fra pasienter med statininduserte muskelbivirkninger (rådata)

Behandling (inkubasjonstid statin 72 t, n = 3, AMD 3)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll	1,365
DMSO kontroll	1,000
AS 100 µM	0,790
AS 200 µM	0,753
AS 400 µM	0,189
AL 100 µM	0,758
AL 200 µM	0,296
AL 400 µM	0,037
SS 100 µM	0,681
SS 200 µM	0,529
SS 400 µM	0,038
SL 10 µM	0,657
SL 50 µM	0,731
SL 100 µM	0,028

Behandling (inkubasjonstid statin 72 t, n = 3, AMD 3)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll	1,470
DMSO kontroll	1,000
AS 100 µM	0,798
AS 200 µM	0,713
AS 400 µM	0,378
AL 100 µM	0,612
AL 200 µM	0,219
AL 400 µM	0,028
SS 100 µM	0,867
SS 200 µM	0,795
SS 400 µM	0,054
SL 10 µM	0,678
SL 50 µM	0,631
SL 100 µM	0,031

Behandling (inkubasjonstid statin 72 t, n = 3, AMD 4)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll	1,240
DMSO kontroll	1,000
AS 100 µM	0,763
AS 200 µM	0,689
AS 400 µM	0,484
AL 100 µM	0,628
AL 200 µM	0,129
AL 400 µM	0,036
SS 100 µM	0,691
SS 200 µM	0,758
SS 400 µM	0,184
SL 10 µM	0,639
SL 50 µM	0,590
SL 100 µM	0,043

Behandling (inkubasjonstid statin 72 t, n = 3, AMD 4)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll	1,155
DMSO kontroll	1,000
AS 100 µM	0,539
AS 200 µM	0,582
AS 400 µM	0,562
AL 100 µM	0,504
AL 200 µM	0,166
AL 400 µM	0,037
SS 100 µM	0,685
SS 200 µM	0,679
SS 400 µM	0,332
SL 10 µM	0,636
SL 50 µM	0,653
SL 100 µM	0,051

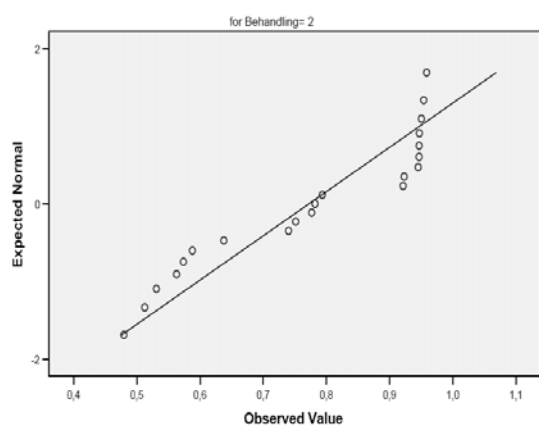
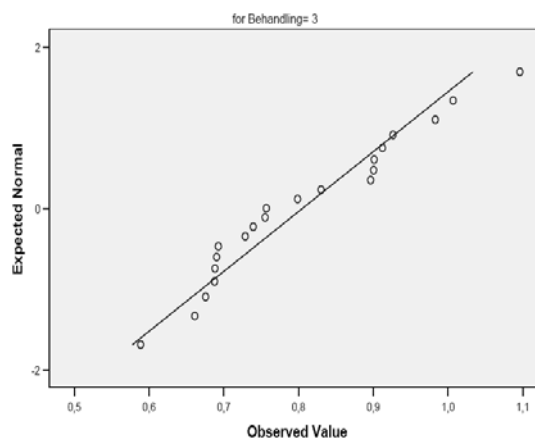
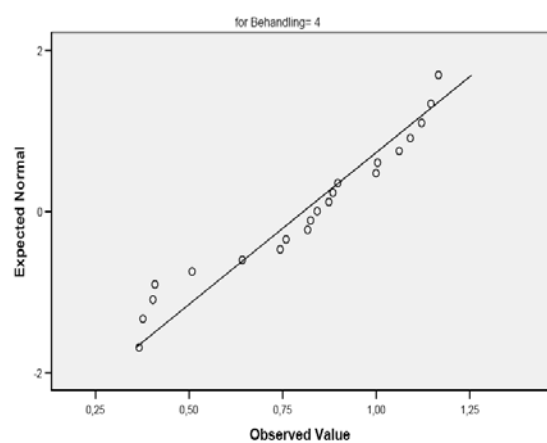
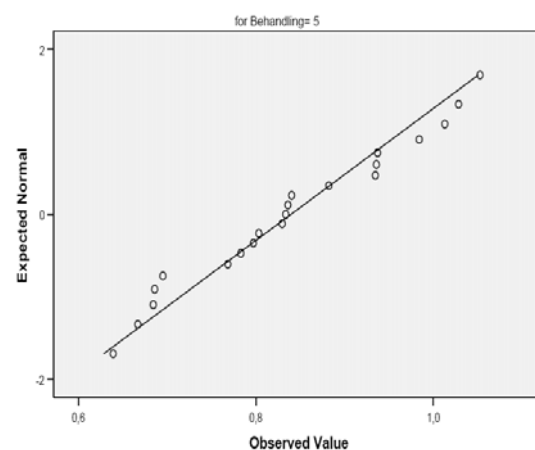
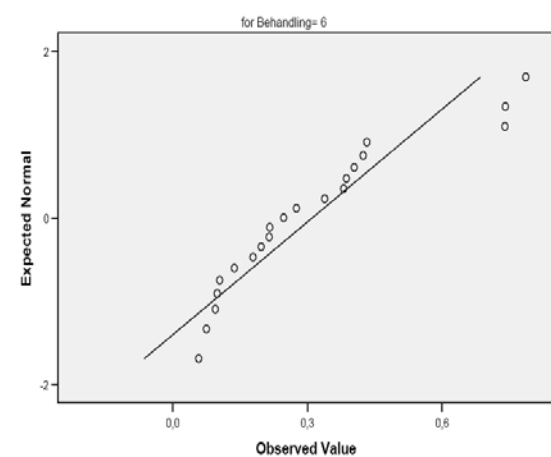
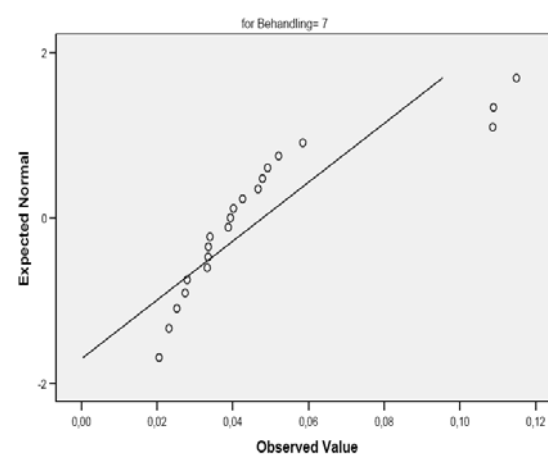
Behandling (inkubasjonstid statin 72 t, n = 3, AMD 5)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll	1,084
DMSO kontroll	1,000
AS 100 µM	0,641
AS 200 µM	0,470
AS 400 µM	0,508
AL 100 µM	0,443
AL 200 µM	0,091
AL 400 µM	0,015
SS 100 µM	0,541
SS 200 µM	0,480
SS 400 µM	0,064
SL 10 µM	0,347
SL 50 µM	0,257
SL 100 µM	0,012

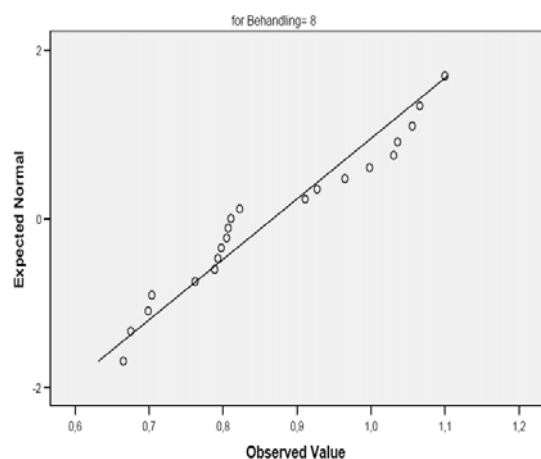
Behandling (inkubasjonstid statin 72 t, n = 3, AMD 5)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll	1,206
DMSO kontroll	1,000
AS 100 µM	0,628
AS 200 µM	0,760
AS 400 µM	0,633
AL 100 µM	0,646
AL 200 µM	0,139
AL 400 µM	0,021
SS 100 µM	0,724
SS 200 µM	0,596
SS 400 µM	0,132
SL 10 µM	0,576
SL 50 µM	0,429
SL 100 µM	0,015

Behandling (inkubasjonstid statin 72 t, n = 3, AMD 6)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll	1,762
DMSO kontroll	1,000
AS 100 µM	0,794
AS 200 µM	0,627
AS 400 µM	0,332
AL 100 µM	0,666
AL 200 µM	0,540
AL 400 µM	0,014
SS 100 µM	0,799
SS 200 µM	0,451
SS 400 µM	0,050
SL 10 µM	0,885
SL 50 µM	0,642
SL 100 µM	0,010

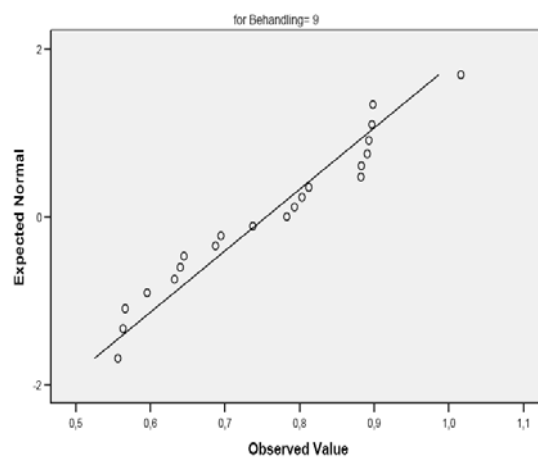
Behandling (inkubasjonstid statin 72 t, n = 3, AMD 6)	Ratio levende celler mot DMSO kontroll
Kontroll	1,631
DMSO kontroll	1,000
AS 100 µM	0,587
AS 200 µM	0,503
AS 400 µM	0,189
AL 100 µM	0,304
AL 200 µM	0,067
AL 400 µM	0,026
SS 100 µM	0,815
SS 200 µM	0,536
SS 400 µM	0,053
SL 10 µM	0,621
SL 50 µM	0,556
SL 100 µM	0,029

12.7 Normalfordeling av rådata fra friske frivillige

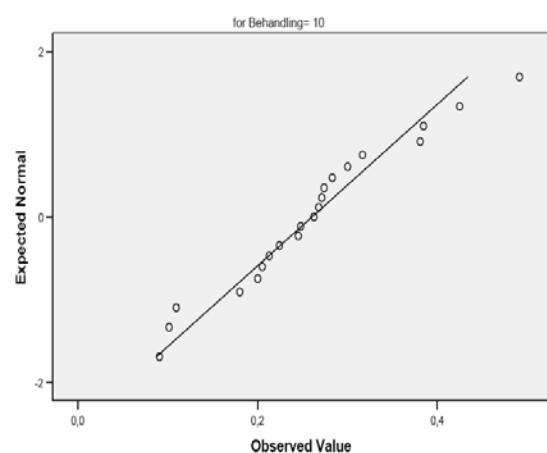
Atorvastatin syre 100 μM Atorvastatin syre 200 μM Atorvastatin syre 400 μM Atorvastatin lakton 100 μM Atorvastatin lakton 200 μM Atorvastatin lakton 400 μM



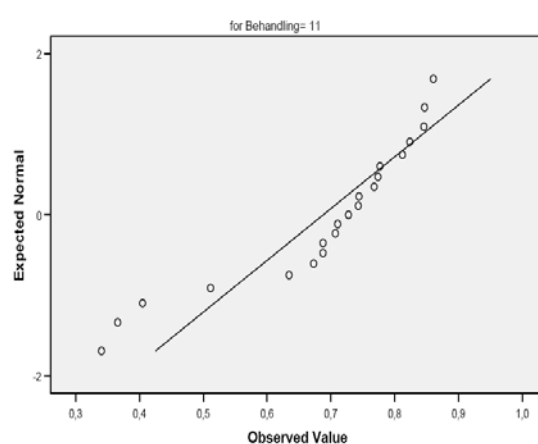
Simvastatin syre 100 μM



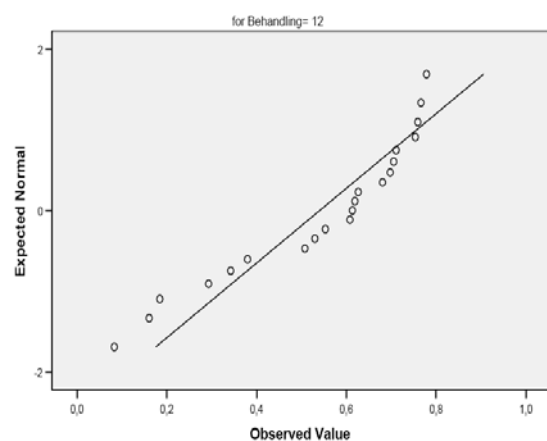
Simvastatin syre 200 μM



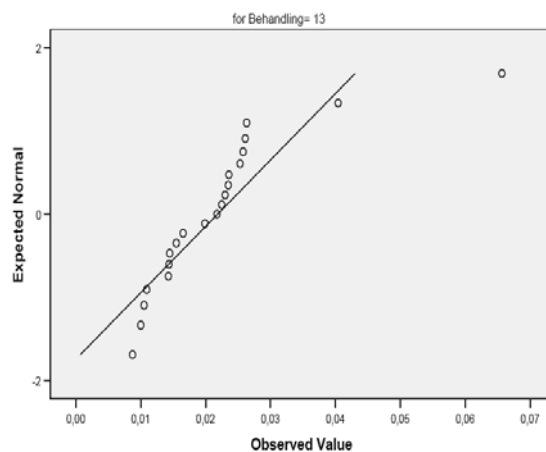
Simvastatin syre 400 μM



Simvastatin lakton 10 μM

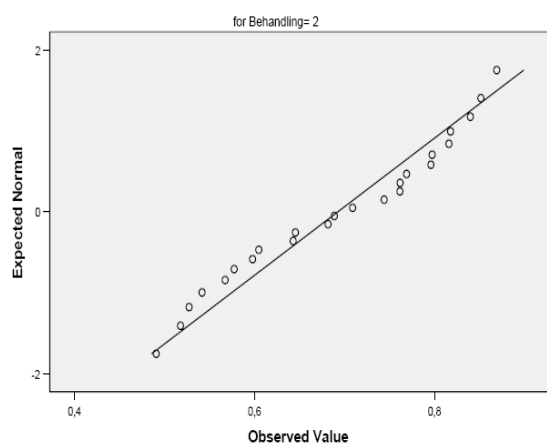
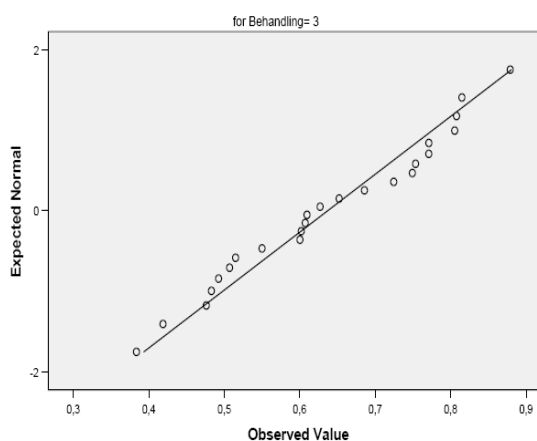
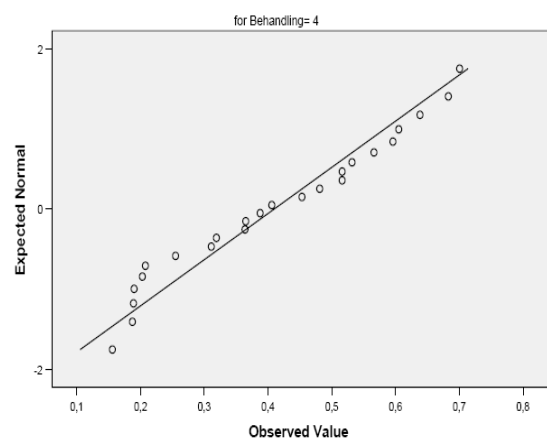
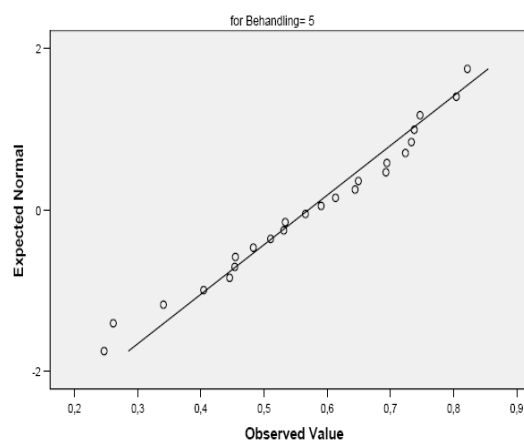
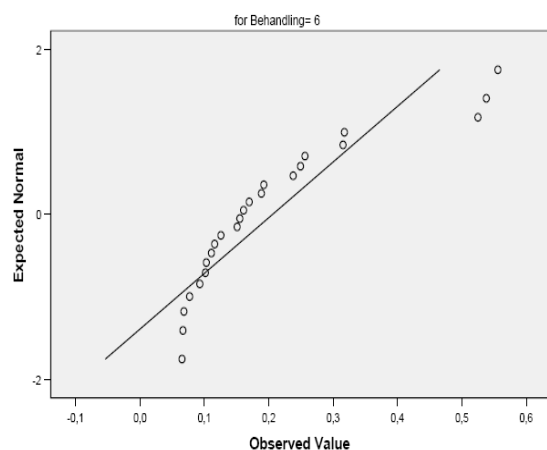
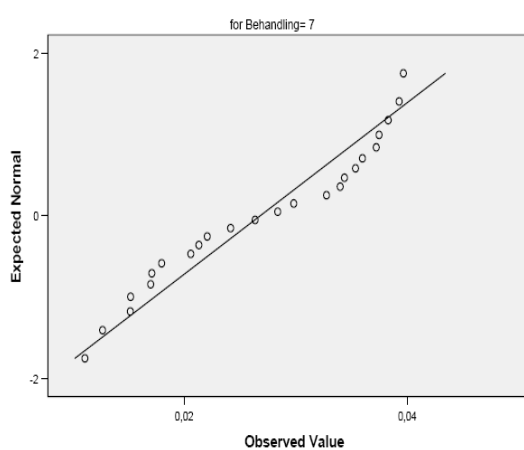


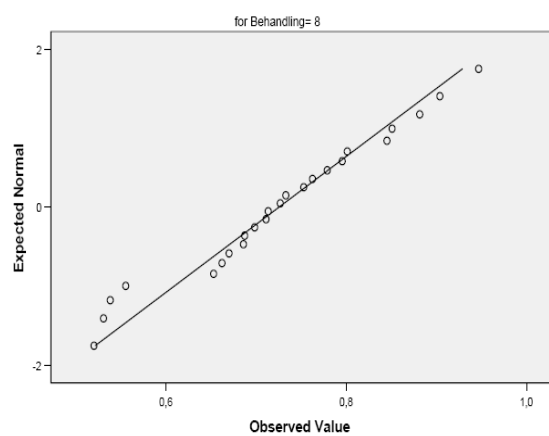
Simvastatin lakton 50 μM



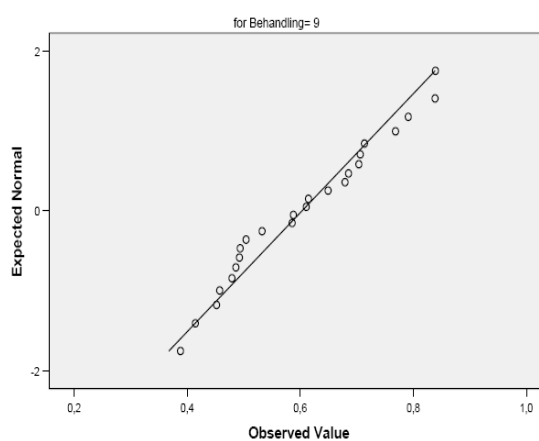
Simvastatin lakton 100 μM

12.8 Normalfordeling av rådata fra pasienter

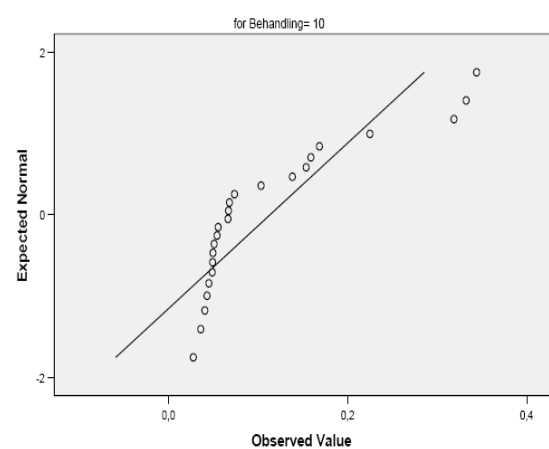
Atorvastatin syre 100 μM Atorvastatin syre 200 μM Atorvastatin syre 400 μM Atorvastatin lakton 100 μM Atorvastatin lakton 200 μM Atorvastatin lakton 400 μM



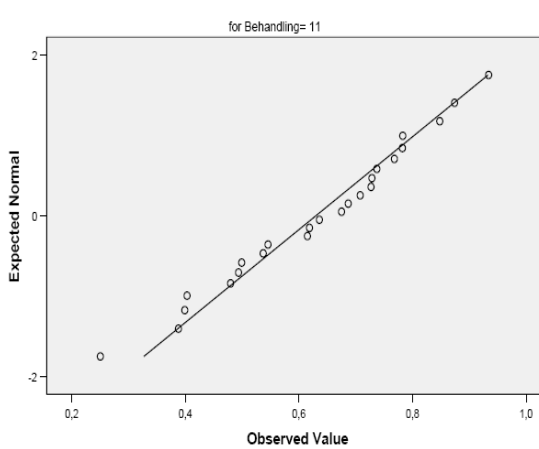
Simvastatin syre 100 µM



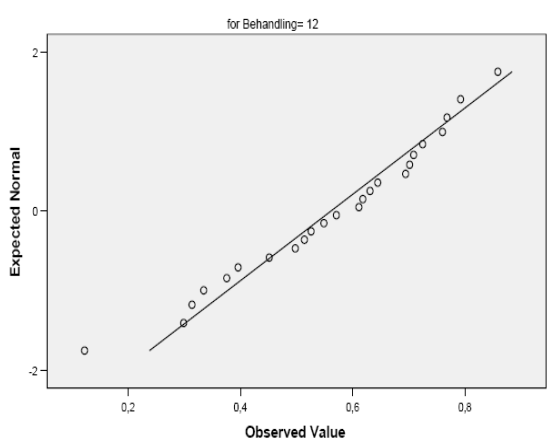
Simvastatin syre 200 µM



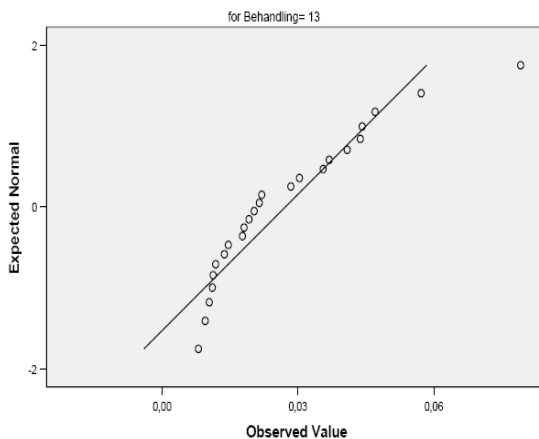
Simvastatin syre 400 µM



Simvastatin lakton 10 µM



Simvastatin lakton 50 µM



Simvastatin lakton 100 µM